

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jochen Herms

**Entwicklung einer krankheitsmodifizierenden Therapie für Morbus
Parkinson**

-

**Wirkung des Proteinaggregationsmodulators anle138b und Derivaten
in einem transgenen Mausmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Cathrin Anna Böhm

aus Nürnberg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Armin Giese
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler Prof. Dr. Robert Perneczky
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD. Dr. med. Johannes Levin
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	27.02.2018

A. Inhaltsverzeichnis

B. Einführung

1. Neurodegenerative Erkrankungen	6
2. Der Morbus Parkinson	6
2.1 Epidemiologie	8
2.2 Ätiologie	9
2.2.1 Genetische Disposition	10
2.2.2 Umweltfaktoren	10
2.3 Symptomatische therapeutische Ansatzpunkte	11
3. α-Synuclein	13
3.1 Struktur von α -Synuclein	13
3.2 Physiologische Funktion	15
3.3 Bedeutung von α -Synuclein in der Pathophysiologie	16
4. Potenzieller Ansatzpunkt zur Entwicklung einer gegen pathologische α-Synuclein Aggregation gerichteten Therapie	18
5. Stand der Entwicklung der 3,5-diphenyl-pyrazole (DPP) vor Beginn der Arbeit	19
5.1. Chemie der Substanzen	22
5.1.1 Anle138b	24
5.1.2 Sery335b	24
5.1.3 Sery383	25
5.1.4 Anle253b	25
6. Zielsetzung	27

C. Material und Methoden

1. Mausmodell	29
1.1 Genetische Abstammung	29
1.2 Transgenes Mausmodell	29
1.3 Versuchsgruppen	29
1.4 Tierfütterung	31

1.5 Tierhaltung	32
2. Messungen mit dem RotaRod	33
2.1 Das RotaRod	33
2.2 Erhebung der Messdaten	36
3. Entnahme der Versuchstiere	36
4. Präparation	37
5. Histologische Untersuchungen	37
6. Histologische Auswertung	38

D. Ergebnisse

1. Laufleistungen der Versuchstiere	40
1.1 Absolute Laufleistung der Versuchstiere	41
1.2 Relative Laufleistung der Versuchstiere	45
1.3 Laufleistungen im Gruppenvergleich	48
2. Gewichtsentwicklung	49
2.1 Relative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	51
3. Kaplan Meier Kurven	55
3.1 Verlängerte Überlebenszeit ohne Krankheitssymptome	57
3.2 Absolute Überlebenszeit	62
4. Histologische Ergebnisse	67
4.1 Aggregation im Gehirn bei terminaler Erkrankung	67
4.2 Histologische Auswertung der Schnittbilder des Gehirns	69
4.3 Histologische Auswertung der Schnittbilder der inneren Organe	71
5. Nebeneffekte	73

E. Diskussion

1. Technische Diskussion	75
1.1 Auswahl der Substanzen	75
1.2 Mausmodell	75
1.3 Erhebung der klinischen Daten	76

1.4 Histologische Beurteilung	77
2. Diskussion der getesteten Substanzen	78
2.1 Vergleich der Substanzgruppen	78
2.1.1. Anle138b bei Substanzgabe nach der 30. Lebenswoche	78
2.1.2 Sery335b	79
2.1.3 Sery383	80
2.1.4 Anle253b	80
2.2 Anle138b bei Substanzgabe nach der 50. Lebenswoche	82
3. Struktur-Wirkungs-Verhältnisse der DPP im Experiment	84
3.1 Die Rolle der Halogenide in R3 Position	84
3.1.1 Halogene in neuen Medikamenten	85
3.2 Der Einfluss der Amine auf die Pharmakokinetik	86
4. Einordnung in den Kontext	87
5. Ausblick	92
F. Zusammenfassung	94
G. Abkürzungsverzeichnis	96
H. Abbildungsverzeichnis	99
I. Tabellenverzeichnis	101
J. Literaturverzeichnis	102
K. Danksagung	115

B. Einführung

1. Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind gekennzeichnet durch den fortschreitenden Verlust von Nervenzellen in bestimmten Hirnregionen. Die klinische Symptomatik ist vielgestaltig. Häufig zeigen die Patienten Gedächtnis- und/oder Bewegungsstörungen (1).

Fehlgefaltete und aggregierte Proteine sind das gemeinsame Merkmal der Pathogenese der meisten neurodegenerativen Erkrankungen (2). In der Krankheitsentstehung dieser Erkrankungen geht man davon aus, dass Aggregatzwischenstufen, sogenannte Oligomere, die aus Markomolekülen mit wenigen Einheiten bestehen, mit dem Nervenzelltod in Zusammenhang stehen (3).

Die Pathogenese unterscheidet sich bei unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen durch die Art der abgelagerten Proteine. Zum Beispiel findet man bei transmissiblen spongiformen Enzephalopathien Aggregate von Prion-Proteinen und bei Morbus Alzheimer (AD), als häufigster neurodegenerativer Erkrankung unserer Zeit, Tau-Protein- intrazellulär und Amyloid- β -Aggregate extrazellulär.

Bei Synucleinopathien, zu denen der Morbus Parkinson (PD) gehört, liegen α -Synuclein-Aggregate im Zytoplasma der Neuronen vor (2).

2. Der Morbus Parkinson

Morbus Parkinson (PD) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Synucleinopathie. Zu diesen gehören weiter die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) und die multiple Systematrophie (MSA) (4). DLB wie auch PD sind durch Lewy-Körperchen (Lewy Bodies, LB) in den Neuronen charakterisiert. LB sind Zelleinschlüsse im Zytoplasma, die oft in Kernnähe entdeckt werden. Sie bestehen aus α -Synuclein und anderen Proteinablagerungen. LB werden in den betroffenen Hirnregionen gefunden, z.B. in den Zellen der Substantia nigra, aber auch in kortikalen Nervenzellen. MSA zeichnet sich durch sogenannte *glial cytoplasmic inclusions* (GCI) in den Gliazellen (2) aus. Findet man Ablagerungen von aggregiertem α -Synuclein in Neuriten, spricht man von Lewy-Neuriten (5-8).

Neuropathologisch ist ein Hauptcharakteristikum von PD der Zelluntergang von neuromelaninhaltigen dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta, was zu einem dopaminergen Defizit und damit zu dem charakteristischen Phänotyp führt (8, 9). Neben dem Verlust der Substantia nigra kommt es auch zu Schädigungen in anderen Gehirnnarealen. Der Ort der Beeinträchtigung korreliert mit dem klinischen Krankheitsbild. Der dorsale motorische Kern des Nervus glossopharyngeus, der Kern des Nervus vagus und die anterioren olfaktorischen Kerne sind in einem frühen Krankheitsstadium betroffen. Zu diesem Zeitpunkt sind die typischen motorischen Symptome häufig noch gar nicht zu beobachten. Sie werden erst später bei Befall des Mittelhirns auffällig (8).

Die Diagnosesicherung der Parkinsonerkrankung erfolgt bis jetzt nach den Kriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank. Sie verlangen neben den klassischen Symptomen Rigor, Tremor und Bradykinese, die einseitig beginnende, persistierende Asymmetrie, gutes Ansprechen auf Levodopa (L-Dopa) für länger als 5 Jahre und L-Dopa induzierte Dyskinesien als positive Hinweise auf das Vorliegen von PD (10).

Die internationale Gesellschaft für PD und Bewegungsstörungen (*Movement Disorder Society* MDS) hat neue Diagnosekriterien entwickelt, die PD im Prodromalstadium erkennen sollen. Diese Kriterien werden zunächst nur für Forschungszwecke angewandt. Das prodromale Stadium von PD wird von der MDS definiert, als ein Stadium, in dem Symptome und Anzeichen für die Erkrankung vorhanden, aber noch zu wenig ausgeprägt sind, um eine sichere Diagnose nach den heute gängigen Diagnosekriterien zu stellen. Mithilfe dieser neu definierten Kriterien kann man PD-Patienten im Frühstadium mit $\geq 80\%$ Wahrscheinlichkeit richtig erkennen. Die Voraussagen basieren auf Kalkulationen des individuellen Risikos von prodromalem PD unter Verwendung einer Bayes-Klassifikation. Hierbei fließt das Alter und das Geschlecht in die Berechnung mit ein. Im Weiteren werden diagnostische Informationen einbezogen. Die diagnostischen Informationen setzen sich aus Voraussagen zu individuellen Risikofaktoren, wie Umweltfaktoren und genetischen Faktoren, und aus Ergebnissen diagnostischer Tests zusammen. Diese wiederum berücksichtigen motorische und nicht-motorische klinische Symptome und ergänzende diagnostische Tests (76).

Das klinische Erscheinungsbild von PD tritt auf, wenn 60-70% der dopaminhaltigen Zellen in der Substantia nigra pars compacta untergegangen sind (11). Der Verlust an dem Neurotransmitter Dopamin beträgt dann circa 70-80% und ist für die motorischen Defizite von entscheidender Bedeutung (12). Physiologisch hat Dopamin eine regulierende Funktion im nigro-striatalen System, bei Dopaminmangel kommt es zu Dysfunktionen der sensomotorischen Basalganglienschleife und zur striatalen Enthemmung (13). Es überwiegt dann der indirekte Motorik hemmende Weg. Dieser führt zu den Kardinalssymptomen von PD, nämlich Rigor, Ruhetremor (3-5 Hz) und Bradykinese (10). Der typische Tremor von Parkinson Patienten ist asymmetrisch und manifestiert sich an den Händen. Ebenfalls typische Symptome sind gestörte posturale Reflexe. Im Stadium vor dem Eintreten der beschriebenen Kardinalsymptome leiden betroffene Patienten oft schon an prämotorischen Symptomen, wie der Beeinträchtigungen des Geruchssinns, des Schlafverhaltens, des Vegetativums und an Depressionen (13). Auch gastrointestinale und sexuelle Störungen kommen als Teil der vegetativen Störungen vor (17).

Die Chronologie des Symptomeintritts ist auf die beschriebenen betroffenen Schädigungsorte im Gehirn zurückzuführen. Zunächst treten Störungen zum Beispiel durch Verlust olfaktorischer Neuronen auf, bevor es zu zentral gesteuerten motorischen und im Verlauf zu kognitiven Symptomen wie Gedächtnisschwierigkeiten und schließlich zu Demenz kommt (15).

2.1 Epidemiologie

Im Jahr 2005 waren weltweit circa 4,6 Millionen Menschen von PD betroffen.

In Deutschland sind ca. 0,1-0,3 % der Gesamtbevölkerung betroffen, bei den über 65-Jährigen steigt der Anteil stark an. Die Krankheit manifestiert sich üblicherweise zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr (17).

In der Geschlechterverteilung zeigt sich, dass Männer eineinhalb bis zweimal häufiger betroffen sind als Frauen. Ein Erklärungsversuch für diese Beobachtung ist, dass Östrogene einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von PD haben. Frauen mit Ovariectomie entwickeln eher PD als Frauen ohne diesen Eingriff.

Andere Erklärungen für die ungleiche Geschlechtsverteilung sind eine rezessive Anfälligkeit für das X-Chromosom, Unterschiede im Eisenhaushalt und die unterschiedlichen Lebensweisen von Männern und Frauen (17, 18).

Die Fallzahlen der an PD erkrankten Patienten steigen immer weiter. Dies ist auf die höhere Lebenserwartung der Bevölkerung zurückzuführen. Beruhend auf einer Prävalenzstudie erwartet man eine Steigerung der Parkinson-Fallzahlen um gut 100% in den nächsten 15 Jahren, 2030 sollen bereits 9,3 Millionen Weltbürger betroffen sein (14).

Somit stellt PD eine große Herausforderung für die zukünftige, durch Überalterung und stetiges Wachstum gekennzeichnete Weltbevölkerung dar.

Die Auswirkungen von PD auf des Gesundheitswesen und die Lebensqualität der Betroffenen samt Angehörigen soll im Folgenden kurz umrissen werden.

Aufgrund der oben beschriebenen Symptome der Erkrankung, den körperlichen und im Verlauf auch kognitiven Einschränkungen, gehen soziale Kontakte verloren und Patienten sind oft nur im Anfangsstadium der Krankheit arbeitsfähig. Ein Drittel der Patienten verliert ihren Job im ersten Jahr nach der Diagnose oder ist in den folgenden Jahren nicht mehr Vollzeit arbeitsfähig (13). Der progrediente Verlauf der Erkrankung ist von Patient zu Patient sehr variabel. Im Verlauf der Erkrankung ist jedoch der Großteil der Patienten auf fremde Hilfe angewiesen und braucht als zusätzliches Hilfsmittel den Rollstuhl oder ist bettlägerig (11).

Das öffentliche Gesundheitswesen in Europa gibt 139 Milliarden Euro für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen aus (19, 20).

2.2 Ätiologie

Welche Ursachen zum Krankheitsausbruch führen, ist bis heute nicht im Detail bekannt. Es gibt jedoch prädisponierende Faktoren. So steigt die Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen mit zunehmendem Alter an. Die Vermutung liegt nahe, dass normale Alterserscheinungen den Krankheitsausbruch und -verlauf fördern. Oxidative Änderungen von α -Synuclein, die im Alter häufiger auftreten in Kombination mit Dopamin- α -Synuclein-Addukten können die Aggregation von α -Synuclein fördern (21). Krankhaft aggregierte und fehlgefaltete Proteine sind das pathologische Merkmal von PD. Die Proteinefehlfaltung als das Eintreten eines statistischen Ereignisses mit

konstantem Risiko zu Lebzeiten eines Individuums wird daher auch als eine mögliche Erklärung angesehen (22).

2.2.1 Genetische Disposition

Insgesamt geht man davon aus, dass bis zu 15% der Patienten aufgrund von vererbten Faktoren PD entwickeln (5).

Für die familiäre Form von PD sind 13 Gen-Loci, PARK 2 bis 13, bekannt. Proteasomen, Mitochondrien oder ganze intrazelluläre Signalwege können von den Störungen betroffen sein. Dies wiederum führt zu einem Mangel an Energieträgern, zu oxidativem Stress und einem gestörten Proteinabbau, der die Neurodegeneration fördert (23-25). Eine weitere Ursache für die Aggregation von α -Synuclein sind Mutationen, welche die Protein-Codierung betreffen. Zum Beispiel kann eine veränderte Primärstruktur der Proteine pathologische Aggregation erleichtern (6).

Punktmutationen auf dem PARK1-Gen, das für α -Synuclein codiert, werden autosomal dominant vererbt und unterstreichen die Rolle des α -Synuclein in der Pathogenese der Erkrankung. Bis heute sind vier solcher Punktmutationen bekannt (26, 27).

Duplikationen und Triplikationen des α -Synuclein Genes führen zu erhöhter Proteinkonzentration, die die Wahrscheinlichkeit der α -Synuclein Aggregation erhöht und damit das Erkrankungsrisiko steigert (28-30).

2.2.2 Umweltfaktoren

Rauchen hat bei PD einen protektiven Effekt (31-34). Das Risiko, an PD zu erkranken, ist bei Rauchern um 40% kleiner als bei Nicht-Rauchern (32). Je mehr „Pack years“ ein Mensch angesammelt hat, desto geringer ist die Gefahr, an PD zu erkranken. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Nikotinexposition das Überleben dopaminerger Zellen fördern kann oder es vor der Bildung anderer toxischer Substanzen schützt (34).

Ähnlichen Studien zufolge reduziert auch Koffein das Risiko von PD. Wie beim Rauchen ist auch der Effekt des Kaffeekonsums dosisabhängig (32).

Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Wirkung von grünem Tee auf den Krankheitsverlauf von PD. Der protektive Effekt des in grünem Tee enthaltenen

Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), welches das wirksamste Catechin in grünem Tee darstellt, gilt für kardiovaskuläre Erkrankungen, Adipositas sowie bakterielle und virale Infektionen als gesichert. Man vermutet auch ein reduziertes Risiko an PD zu erkranken, sobald mindestens zwei Tassen Tee am Tag konsumiert werden (2). EGCG wirkt antioxidativ, antiapoptotisch und neuroprotektiv, allerdings ist die Bioverfügbarkeit begrenzt. *In vitro* hemmt EGCG die Aggregation von α -Synuclein (35, 36). In einer groß angelegten aktuellen klinischen Studie wird die Wirkung von EGCG bei atypischen Parkinsonpatienten mit MSA in Gegenüberstellung zu Placebo getestet (Eudra CT Nr.: 2012-000928-18).

Auch die Exposition gegenüber Pestiziden und Herbiziden steht im Zusammenhang mit PD. Vor allem für Menschen, die mit Rotenon und Paraquat in Kontakt kommen, ist ein erhöhtes Erkrankungsrisiko nachgewiesen. Rotenon ist ein Hemmer eines mitochondrialen Komplexes und führt damit zur Dysfunktion der Mitochondrien, Paraquat ist Verursacher von oxidativem Stress. Sowohl mitochondriale Dysfunktionen als auch oxidativer Stress spielen eine Rolle in der Entstehung von PD.

Epidemiologisch haben daher Bauern, die beruflich einen erhöhten Kontakt mit Pestiziden nicht vermeiden können, ein größeres Risiko an PD zu erkranken (37).

Traumatische Hirnverletzungen erhöhen ebenfalls das Risiko an PD zu erkranken. Dies wurde bei Athleten von Kontaktsportarten wie American Football und Eishockey festgestellt, die sich häufiger nach Kopfverletzungen operieren lassen müssen. Sowohl die Zeit der Bewusstlosigkeit, als auch der Eingriff an sich spielen eine Rolle bei der Erkrankungswahrscheinlichkeit. Bei Patienten, die länger als fünf Minuten ohne Bewusstsein waren, ergibt sich ein zweifach erhöhtes Risiko (38).

2.3 Symptomatische therapeutische Ansatzpunkte

Heute gibt es verschiedene etablierte symptomatische Therapiemöglichkeiten für PD, die je nach Krankheitsgrad individuell unterschiedlich angewendet werden.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keinen kausalen Therapieansatz. Die Behandlung der Parkinsonpatienten konzentriert sich folglich darauf, die motorischen, kognitiven und psychiatrischen Symptome zu kontrollieren. Man erhofft sich davon eine Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen und eine Vermeidung von sekundär internistischen oder orthopädischen Komplikationen (13).

Da die Symptome im Anfangsstadium vor allem auf den Mangel an Dopamin zurückzuführen sind, werden initial in erster Linie dopaminerg wirksame Präparate verschrieben.

Dopaminagonisten (Bromocriptine, Pergolid u.a) binden direkt an die striatalen Dopaminrezeptoren und stimulieren diese (39, 41). Hierbei muss keine Vorstufe von Dopamin, z.B. L-Dopa, zu Dopamin metabolisiert werden, der Transmitter muss nicht gespeichert werden und nicht aus degenerierenden nigrostriatalen Nervenendigungen freigesetzt werden (41).

Diese Therapieform ist als Monotherapie bei Patienten unter 70 Jahren empfohlen. Bei der initialen Behandlung mit Dopaminagonisten im Vergleich zur sofortigen Behandlung mit L-Dopa, treten Wirkfluktuationen wesentlich später auf (40).

L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) ist die effizienteste und nebenwirkungsärmste Medikation in der Parkinsontherapie. L-Dopa ist eine Vorstufe des Dopamins und Blut-Hirn-Schranken gängig. Es fördert die Dopaminbildung in nigro-striatalen Neuronen und ersetzt den Neurotransmitter, der aufgrund des apoptotischen Untergangs fehlt. Es wird von den dopaminergen Neuronen aufgenommen und zu Dopamin decarboxyliert.

Heute wird L-Dopa nur noch mit einem peripheren Hemmstoff der Aminosäuredecarboxylase (DDI; z.B. Benserazid) verabreicht, da es durch Reduzierung des L-Dopa Metabolismus die Plasmahalbwertszeit erhöht und das Präparat um das vier- bis fünffache effektiver macht. Außerdem werden die üblichen unerwünschten Nebenwirkungen von L-Dopa wie Übelkeit und Erbrechen herabgesetzt (41).

Aktuelle Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie empfehlen die Gabe von L-Dopa als Standardtherapie erst bei Patienten über 70 Jahren. Bei längerer Einnahme von L-Dopa können motorische Komplikationen und Dyskinesien auftreten. Dies ist bei 30 % der Patienten nach >5 jähriger Therapie mit diesem Präparat der Fall (13).

MAO-B Hemmer erhöhen den Dopaminspiegel im synaptischen Spalt, indem sie durch selektive Hemmung der Monoaminoxidase B den Abbau verzögern (42).

Catechyl-O-Methyltransferase-Inhibitoren (COMT-Hemmer) werden für die Therapie von motorischen Fluktuationen und *end of dose* Hypokinesien verwendet. Sie verlangsamen den Abbau von Dopamin und L-Dopa zu ihren inaktiven Metaboliten und

lindern dadurch die Fluktuationen. COMT-Hemmer werden daher zusammen mit L-Dopa verabreicht (39).

Als neurochirurgische Interventionsmöglichkeit ist die tiefe Hirnstimulation zu nennen. Zur Anwendung kommt sie z.B. bei Patienten im mittleren bis späten Krankheitsstadium mit Wirkfluktuationen. Das Indikationsspektrum ist eng (43-46).

Die aufgezeigten Therapien lindern lediglich die Symptome der Erkrankung.

Ein Medikament, welches PD kausal therapiert, würde das Fortschreiten der Erkrankung verhindern. Bei Monotherapie mit einem solchen Präparat würden Nebenwirkungen, die durch Interaktionen unterschiedlicher Präparate zustande kommen, vermieden werden können. Die Lebensqualität der Patienten wäre nachhaltig verbessert.

3. α -Synuclein

3.1 Struktur von α -Synuclein

Synuclein ist ein im Gehirn physiologisch vorkommendes Peptid, das 0,5-1% des Gesamtproteingehalts im zentralen Nervensystem ausmacht (7). Es kommt in drei bekannten Isoformen vor. Die bekannteste Isoform ist die full-length Form oder auch α -Synuclein-140 bezeichnet. α -Synuclein-126 entsteht daraus durch Deletion der Aminosäuren 41-54 im Exon 3, α -Synuclein-112 durch Deletion der Aminosäuren 103-130 im Exon 5 (48,49). Die full length Form ist ca. 14 kDa schwer (7). Im nativen Zustand liegt es ungefaltet vor und löst sich gut in Wasser (7, 49). Das Molekül gliedert sich in drei Abschnitte, das N-terminale Ende, das C-terminale Ende und die sogenannte non-amyloid- β component Region (NAC) (siehe Abb. 1).

Das N-terminale Ende besteht aus den Aminosäuren 1-60, die sich grob in vier ähnliche, 11 Aminosäuren lange Sequenzen mit dem Konsensusmotiv KTKEGV gliedern. Zwei weitere Sequenzen mit diesem Konsensusmotiv sind am Übergang zur NAC-Region bzw. innerhalb der NAC-Region zu finden.

Die für die hereditären Formen von PD bekannten Punktmutationen liegen alle im N-terminalen Bereich von α -Synuclein (A30P, E46K, H50Q, G51D und A53T) (26, 27, 50, 51).

Die Aminosäuren 61 bis 95 bilden die zentrale NAC-Region. Diese kommt in ähnlicher Form bei Alzheimer vor. Dort ergab eine Analyse von amyloiden Plaques eine 35 Aminosäuren lange Sequenz, die als „non-amyloid- β component of amyloid plaques“ bezeichnet wurde. Diese ist namensgebend für die NAC-Region in α -Synuclein (52). Sie sind größtenteils hydrophob. Diese Eigenschaft führt zu dem stark amyloidogenen und β -Faltblatt fördernden Charakter. Damit ist diese Aminosäuresequenz entscheidend für das Aggregationsverhalten von α -Synuclein (53). Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen gibt es eine ähnliche pathologische Proteinaggregation, etwa bei Prionerkrankungen und Morbus Alzheimer. Bei beiden Krankheiten liegen im Prion-Protein bzw. A β Aminosäuresequenzen vor, die als Konsensusmotive zu der Sequenz in der NAC-Region von α -Synuclein gesehen werden (48,49).

Das C-terminale Ende von α -Synuclein (Aminosäuren 96-140) besitzt viele saure Aminosäuren und ist dadurch bei physiologischem pH-Wert negativ geladen. Die am C-terminalen Ende häufiger vorkommenden Aminosäuren Tyrosin und Serin sind Angriffsstellen für eine potentielle Phosphorylierung oder Nitrosylierung. Bei Proteinen mit pathologischer Struktur wird ein aggregationsfördernder Effekt unter anderem durch diese posttranslationale Phosphorylierung beobachtet. Man hat festgestellt, dass aus Lewy Bodies isoliertes α -Synuclein an Serin an Position 129 phosphoryliert ist (6, 54, 55).

Das C-terminale Ende ist außerdem Angriffspunkt für Metallionen, die die krankhafte Aggregation beschleunigen können (56).

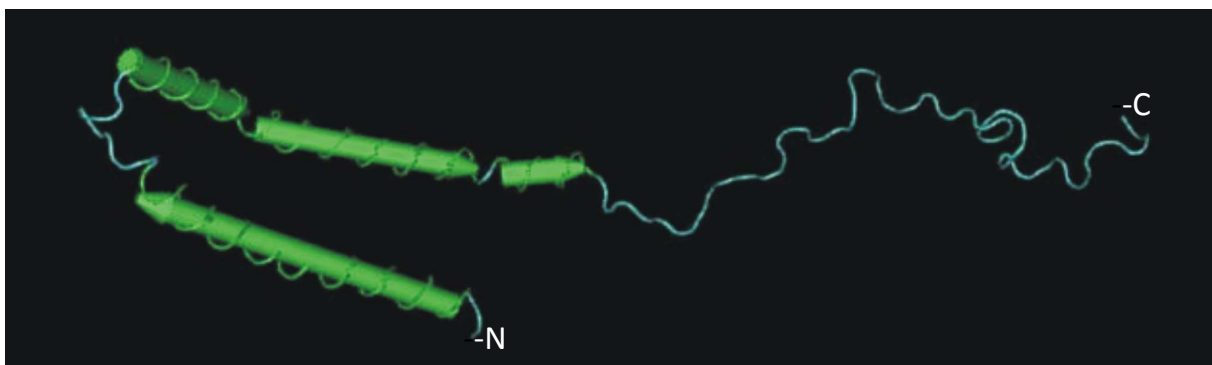


Abb. 1: Dreidimensionale Darstellung von α -Synuclein (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Das N-terminale Ende nimmt bei Interaktion mit

Lipidmembranen die Form amphipatischen α -Helices an. An diesem Ende befinden sich die für die hereditäre Form des PD bekannten Punktmutationsstellen. Das C-terminale Ende ist ungefaltet und Angriffsstellen für eine potentielle Phosphorylierung oder Nitrosylierung.

3.2 Physiologische Funktion

Die Funktion von α -Synuclein ist noch nicht vollständig verstanden. Als gesichert gilt jedoch die Interaktion mit Lipiddoppelmembranen und mit verschiedenen Proteinkomplexen (58).

Kommt α -Synuclein mit negativ geladenen Lipid-Wasser-Grenzflächen, wie sie zum Beispiel bei Lipidmembranen und -vesikeln vorliegen, in Kontakt, ändert sich die Konformation der N-terminalen Region. Aus der in wässriger Lösung ungeordneten Struktur entstehen zwei amphipatische α -Helices, die vergleichbar sind mit der lipid-Bindungsdomäne von Apolipoproteinen. Die C-terminale Region verbleibt ungefaltet (59). Die Bindungsaffinität von α -Synuclein an Lipidmembranen hängt stark von deren Krümmung und der Lipidzusammensetzung ab. Bei starker Krümmung und negativer Ladung der Lipide ist die Bindungsaffinität sehr hoch. Darüber hinaus bindet α -Synuclein aber auch an kleine unilamellare Liposomen, SUVs (small unilamellar vesicles), aus zwitterionischen Lipiden. Es gibt SUVs, welche sich im Gelzustand befinden und deren Oberfläche aufgrund einer starken Krümmung kleine Defekte aufweisen. An diese Defekte bindet α -Synuclein und reduziert so die Tendenz von Lipidmembranen an Defekte zu fusionieren. Im Gegensatz dazu ist die Bindungsaffinität von α -Synuclein an SUVs im kristallinen Zustand mit defektfreier Oberfläche gering (57, 58, 60).

Durch die Lokalisation von α -Synuclein in den präsynaptischen Endigungen vermutet man, dass α -Synuclein an der Stabilisation der synaptischen Membranen beteiligt ist und den synaptischen Vesikelpool mit reguliert (58). Weiterhin könnte α -Synuclein auch bei der Transmitterfreisetzung eine Rolle spielen. Bei einer Überexpression von α -Synuclein wird die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran reduziert (61).

α -Synuclein hat Einfluss auf die Dopaminfreisetzung aus striatalen Neuronen. So wurde bei α -Synuclein Knockout-Mäusen eine erhöhte Dopaminfreisetzung detektiert (62).

Weitere Proteinkomplexe, die an α -Synuclein binden, sind zum Beispiel die Phospholipase D2 und das Chaperon 14-3-3.

Die Phospholipase D2 spielt durch die Spaltung von Phosphatidylcholin bei der Endozytose eine Rolle, sobald α -Synuclein bindet, wird diese inhibiert (63).

Chaperon 14-3-3 dient zur Erkennung und Entsorgung fehlgefalteter Proteine. Darüber hinaus verhindert es die Apoptose von Nervenzellen, indem es einen antagonistischen Effekt auf proapoptotische Faktoren ausübt. Bei der Bindung von α -Synuclein an dieses Protein kommt es zur Sequestrierung des antiapoptotischen Faktors und führt zu einer zytotoxischen Wirkung. Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine wird gefördert (64, 65).

3.3 Bedeutung von α -Synuclein in der Pathophysiologie

Bei neurodegenerativen Erkrankungen können in pathologischen Prozessen verschiedene Arten von fehlgefalteten Proteinen entstehen, amyloide Fibrillen sind eine gut untersuchte Form dieser fehlgefalteten Proteine.

Die für amyloide Fibrillen typische Morphologie beinhaltet eine β -Faltblattstruktur. So gebildete Fibrillen sind in der Regel 0,1-10 μ m lang und bis zu 10nm breit (6).

Amyloide Fibrillen treten sowohl intra- als auch extrazellulär auf (66).

Bei PD findet man pathologisch aggregiertes α -Synuclein in den von der Krankheit betroffenen Hirnregionen (66) (siehe Abb. 2).

Im Reagenzglas ist die Bildung der amyloiden Fibrillen gut untersucht, sie läuft über mehrere Zwischenstufen ab. Die dreidimensionale Struktur dieser Aggregat-Zwischenstufen reicht von ringförmiger und kugelförmiger Struktur bis zu gekrümmten Protofibrillen (67). Für diese Aggregate, welche Vorstufen der Fibrillen sind, wird häufig der Terminus Oligomere verwendet. Oligomere scheinen die für die Toxizität und den Nervenzelltod hauptsächlich verantwortliche Partikelspezies zu sein (68, 69, 70-72). Man vermutet, dass die Oligomere eher toxisch sind als die Fibrillen (73, 74).

Bei der Aggregation von α -Synuclein spielt die NAC Region (siehe 3.1) mit hydrophober Aminosäuresequenz eine wichtige Rolle. Es kommt zur Veränderung der Sekundärstruktur (75). Im Vergleich zu monomerem α -Synuclein verfügen α -Synuclein-Fibrillen über einen höheren Anteil an β -Faltblattstrukturen (54).

Die Bildung von fibrillären Aggregaten aus α -Synuclein-Oligomeren ist abhängig von der Konzentration der löslichen α -Synuclein-Monomere im Zytosol (77).

Es gibt Hinweise, dass große intrazelluläre fibrilläre α -Synuclein-Aggregate, neuroprotektiv wirken, indem sie neurotoxische Oligomere sequestrieren. Auf der anderen Seite ist auch ihre Anwesenheit eine Gefahr, da sich α -Synuclein-Monomere, -Oligomere und -Fibrillen in einem dynamischen Gleichgewicht befinden (77, 78). Interessanterweise zeigen Oligomere aus α -Synuclein eine strukturelle Ähnlichkeit mit Oligomeren anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie etwa Aggregaten aus Prionprotein und A β -Peptid, was einen ähnlichen toxischen Mechanismus nahelegt (79). Weitere Parameter, wie etwa die Phosphorylierung oder andere posttranslationale Modifikationen, haben ebenfalls Einfluss auf die Aggregationstendenz von α -Synuclein (58). Auch die Anwesenheit von dreiwertigen Metallionen spielt eine Rolle und erhöht die Aggregationstendenz (69, 78). Vor allem Fe^{3+} fördert die Bildung von Oligomeren von intrazellulärem α -Synuclein und damit auch die Zytotoxizität (9, 69). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress die Bildung von eiseninduzierten Oligomeren fördert (78).

Oligomere unterscheiden sich von α -Synuclein-Monomeren stark in ihrem Bindungsverhalten an Lipidmembranen, zum Beispiel binden α -Synuclein-Monomere nicht an defektfreie Membranen. Eiseninduzierte Oligomere binden unabhängig von Ladung und Lipidzusammensetzung an die Membran. Außerdem regen diese Vesikel die Bildung von α -Synuclein-Oligomeren zusätzlich an (57, 80). Diese können die Membranen von Zellorganellen so schädigen, dass es zum Funktionsverlust der Zellorganelle und letztlich zum Zelltod kommt (81).

Eisen spielt auch im klinischen Bild von PD eine große Rolle. Sowohl die Substantia nigra als auch der Hirnstamm, die beiden bei PD am stärksten von der Neurodegeneration betroffenen Regionen, weisen eine sehr hohe Neuromelaninkonzentration auf. Diese wiederum bindet und sequestriert viele Eisenionen. Bei *post mortem* untersuchten Patienten, die unter PD gelitten haben, lässt sich ein Anstieg des Eisenspiegels in den betroffenen Hirnregionen feststellen, der mit dem Schweregrad der Krankheit korreliert. Darüber hinaus zeigt sich eine Verschiebung des Gleichgewichtes von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisenionen (81, 82). Mit Hilfe bildgebender Verfahren wie dem MRT können bei PD Patienten erhöhte Eisenkonzentrationen in den betroffenen Hirnregionen detektiert werden. Weiterhin ist ein Anstieg des Eisengehaltes im Gehirn von 35% bei an Parkinson Erkrankten gegenüber nicht erkrankten Probanden festgestellt worden (82). Daraus ergeben sich

neue therapeutische Ansätze, die darauf abzielen, die Eisenkonzentration niedrig zu halten (83, 84).

Eine Vermutung, wie es zu der Toxizität der Oligomere kommt, ist eine Porenbildung in der Zellmembran die durch die ringförmigen Intermediate verursacht wird (67). Dabei lagern sich die Oligomere in die Lipidmembran ein und bilden damit die ionendurchlässigen Poren, die mit dem Nervenzelltod in Zusammenhang stehen könnten (70, 85, 86).

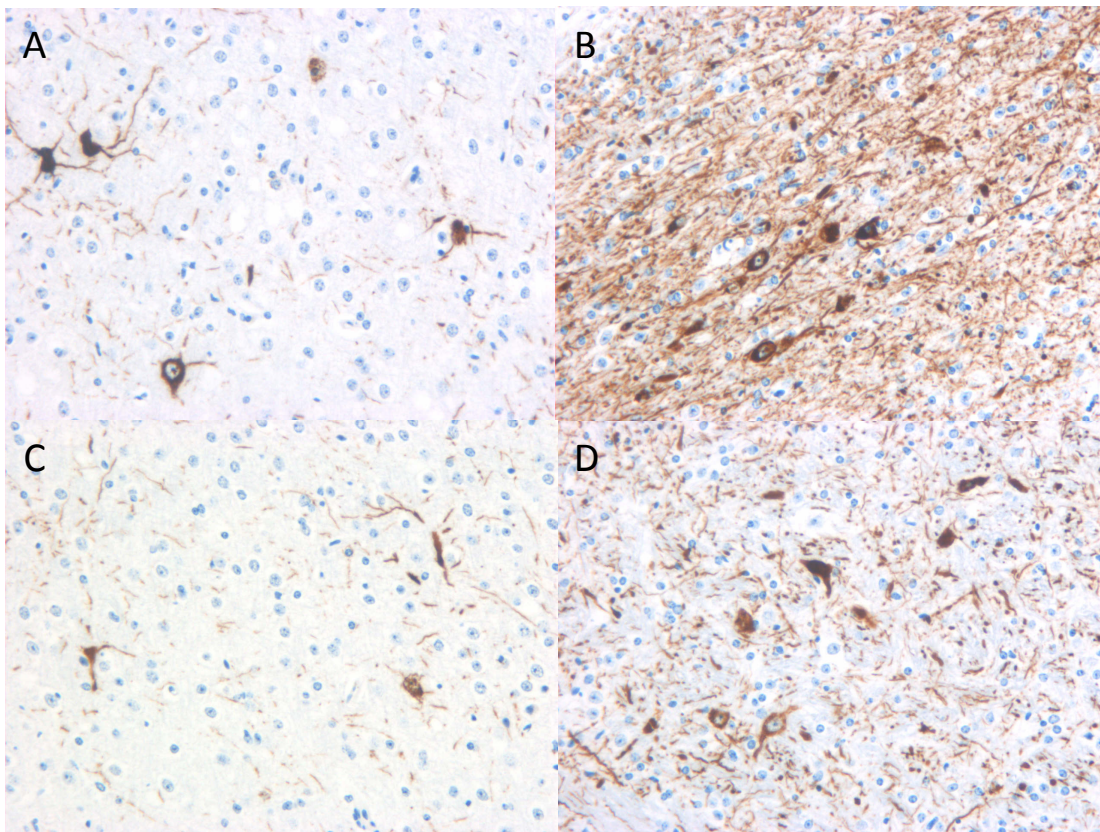


Abb. 2: Pathologische α -Synuclein-Oligomere im histologischen Bild von α -Synuclein überexprimierenden transgenen Mäusen. Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper 15G7 zeigen **A** im Frontalen Cortex, **B** im Mittelhirn, **C** im Hirnstamm und **D** im Kleinhirn Proteinase K resistente Ablagerungen von aggregiertem α -Synuclein.

4. Potenzieller Ansatzpunkt zur Entwicklung einer gegen pathologische α -Synuclein Aggregation gerichteten Therapie

Es liegen große Hoffnungen auf der Erforschung und Erprobung neuer Medikamente gegen PD, zum einen weil man auch bei einem Misserfolg des Tests dem Verständnis der Erkrankung mit seinem Pathomechanismus ein Stück näher kommt, zum anderen, weil

die Mechanismen nicht nur für PD von Bedeutung sind, sondern bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen ähnlich ablaufen (6).

Anle138b und seine Derivate sind kleine Moleküle aus der Klasse der Diphenyl-Pyrazole, die die Bildung von α -Synuclein-Oligomeren hemmen. Anle138b ist in der Lage, die de-novo Aggregation krankhafter Oligomere zu reduzieren bzw. zu stoppen. Wichtig ist hierbei, dass anle138b nicht die Gesamtkonzentration an physiologischem α -Synuclein verändert, sondern lediglich in die pathologischen Aggregationen eingreift.

Es greift an Fibrillen, nicht an Monomeren an und behindert nicht die physiologische Funktion von α -Synuclein (87).

5. Stand der Entwicklung der 3,5-diphenyl-pyrazole (DPP) vor Beginn der Arbeit

Zur Entwicklung der antiaggregativen Wirksubstanzen wurden zwei Datenbanken DIVERSet1 und DIVERSet2 mit je 10000 Substanzen, die potentiell die Aggregation von Prion Proteinen hemmen, gescreent. Beide Datenbanken sind Teil einer größeren DIVERSet Bibliothek (ChemBridge Corp., San Diego, CA), die kleine Moleküle enthält, die potentiell als Medikament verwendet werden können.

Im ersten Schritt wurden die Substanzen mithilfe der SIFT Technologie (scanning for intensely fluorescent targets), die auf fluoreszenzbasierter Einzelmolekülspektroskopie beruht und zur funktionellen und strukturellen Analyse von Proteinaggregaten verwendet werden kann, getestet (siehe Abb. 3). Der SIFT Assay wurde neben der Nutzung als Hochdurchsatzverfahren für pharmakologische Ansatzpunkte in der kausalen Therapie neurodegenerativer Erkrankungen entwickelt, um die Pathomechanismen eben dieser Krankheiten zu untersuchen. Seine Vorteile bei der Detektion liegen unter anderem in der hohen Sensitivität (95). Weitere Vorteile des SIFT Assays sind kurze Messzeiten und geringe Probevolumina, die verwendet werden können, und der geringe Materialverbrauch (96). Mithilfe dieses Verfahrens war es möglich, aus 10000 Substanzen geeignete Leitstrukturen mit antiaggregativen Eigenschaften für Prionprotein zu identifizieren (97, 98).

Ergänzend wurden die Substanzen in Zellkulturen auf ihre Wirkung bezüglich Anti-Prion Aktivität untersucht. Aus beiden Experimenten ergab sich, dass N-benzylidenebenzohydrazide (NBB) und ihre Derivate geeignet sind, die Prionaktivität zu stoppen. Den gleichen Effekt hatten die Substanzen auf α -Synuclein Aggregation.

Neben den NBB's wurde eine weitere Substanzklasse, die 3,5-diphenyl-pyrazole (DPP), als ebenfalls geeignet für die Inhibierung der Prionaggregation ausgemacht. Dafür wurden 10000 zusätzliche Substanzen zusammen mit den ursprünglichen in Mikrotiterplatten auf Anti-Prion Aktivität getestet und anschließend eine Strukturanalyse vorgenommen.

Zunächst wurden die NBB's weiter getestet. Der Effekt auf die Prionaggregation war im Tiermodell nicht nachweisbar. Eine Vermutung war, dass die in NBB's enthaltene Schiff'sche Base zu einem schnellen Metabolismus führte.

DPP's aus einer fokussierten Substanzbibliothek mit über 150 neu synthetisierten Substanzen, die alle 3,5 diphenyl-pyrazole (DPP) als Leitstruktur besaßen, zeigten einen guten Effekt (siehe Abb.4).

Erste Experimente mit DPP's *in vivo* zeigten einen signifikanten Effekt auf die Überlebenszeit Prion-infizierter Mäuse. Für die weitere Erprobung im Tier wurden noch etwa 60 DPP's mit vielversprechender Wirkung ausgewählt. Die Substanzen wurden bei den Tests jeweils oral verabreicht.

In diesen Experimenten zeigte anle138b (5-(3-Bromphenyl)-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)pyrazole) eine sehr hohe Anti-Prionaktivität (87).

DPP-Derivate wurden aufgrund der Gemeinsamkeit, dass Proteinaggregation sowohl bei α -Synucleinopathien als auch bei Prionerkrankungen eine wichtige Rolle spielt, auch auf die Wirksamkeit bei ersteren getestet (99). Auch hierbei wurden DPP's gefunden, die eine hemmende Wirkung auf die Oligomerbildung von α -Synuclein haben. Anle138b zeigte erneut eine gute Aggregationshemmung. Die Pharmakokinetik von anle138b zeigte eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit und Blut-Hirnschranken-Gängigkeit. Es konnte gezeigt werden, dass (i) anle138b bei oraler Verabreichung konstant ca. 50% AUC (area under the curve) erreicht im Gegensatz zu einer intraperitonealen Gabe, (ii) dass bei der Verabreichung in Erdnussbutter anle138b langsamer resorbiert wird und länger verfügbar ist, (iii) dass höhere Dosen zu proportional höheren Serumkonzentrationen und Konzentrationen im Hirn führen und (vi) dass anle138b eine dreifach höhere Konzentration im Gehirn hat als im Serum, dies lässt auf eine sehr gute Blut-Hirnschranken-Gängigkeit schließen (100).

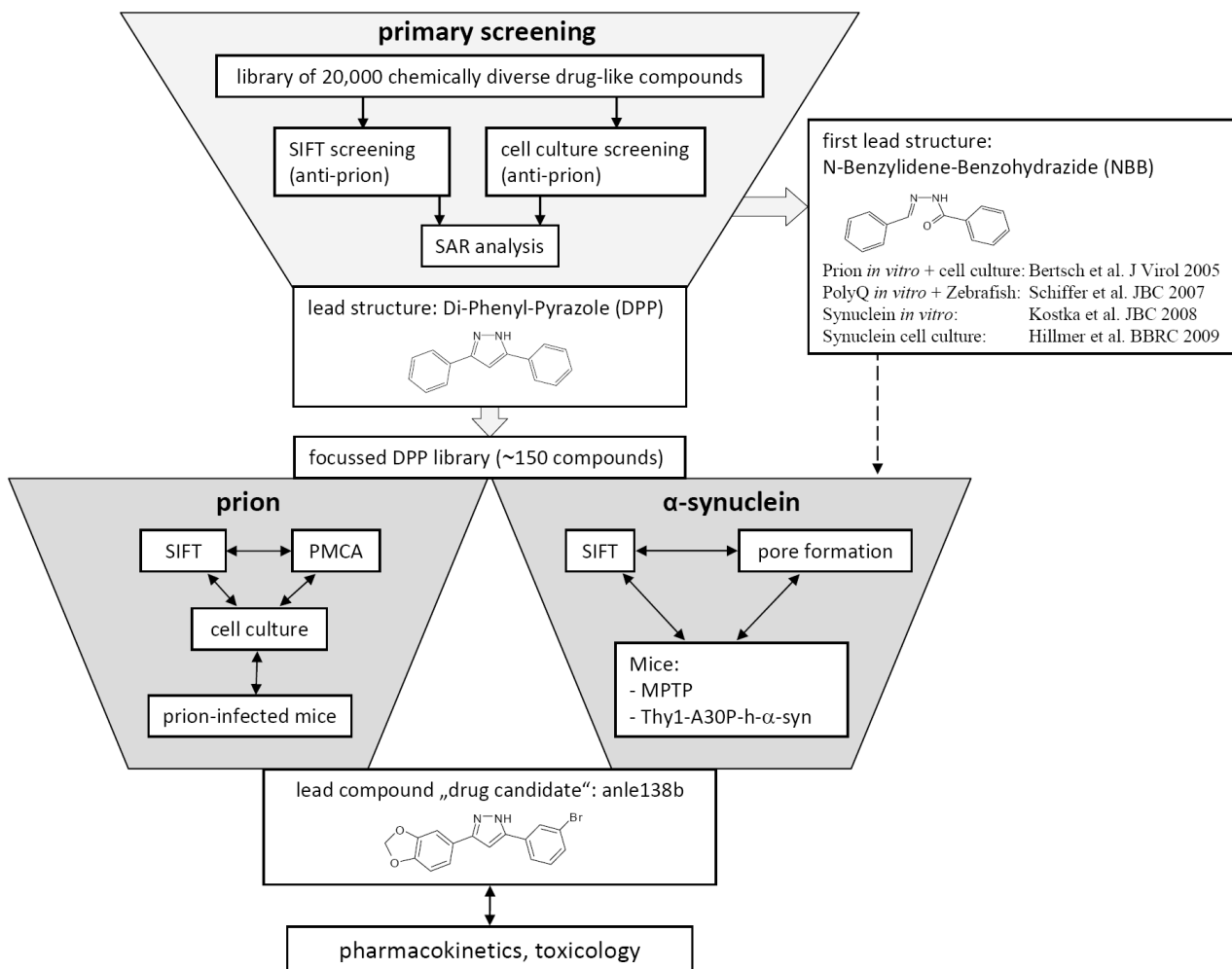


Abb. 3: Experimenteller Verlaufsplan zur Etablierung einer neuen therapeutischen Substanz für Morbus Parkinson (87). In der ersten Versuchsphase wurden aus einer Bibliothek mit 10000 medikamentenähnlichen Substanzen mithilfe des SIFT Assays diejenigen identifiziert, welche die stärkste Inhibition von Aggregation des Prionproteins aufweisen. Aus diesen Ergebnissen, zusammen mit den Ergebnissen eines zellulären Prion Assay, ging N-benzylidene-benzohydrazide (NBB) als Leitstruktur mit hoher anti-Prion Aktivität hervor. Die gleichen Substanzen zeigten ebenfalls Wirksamkeit bei der Inhibition von α -Synuclein Aggregationen *in vitro* und *in vivo*. Da NBBs eine Schiffsche Base enthalten, die unter Umständen zu einem schnellen Metabolismus *in vivo* führt, wurde eine weitere Bibliothek mit 10000 zusätzlichen Substanzen auf ihre Eignung als Medikament getestet. Alle 20000 Substanzen wurden parallel auf Mikrotiterplatten in einem weiteren anti-Prion Assay getestet. Es folgte eine Struktur-Aktivität und Clusteranalyse. Diese Analyse zeigte ein Cluster von sehr aktiven Substanzen, die zur Stoffklasse der Diphenyl-pyrazole (DPPs) gehören. Erste Experimente mit DPPs zeigten einen signifikanten Effekt auf das Überleben von Prion infizierten Mäusen. Mit diesen Substanzen wurden weitere Tests im Hinblick auf die therapeutischen Effekte bei Prion und α -Synuclein-Aggregationen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen von SIFT und Zellkulturassay wurden 38 Substanzen für die Versuche an Prion-infizierten Mäusen ausgewählt. In diesen Experimenten zeigt anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole] die höchste anti-Prion Aktivität. Ebenfalls konnten *in vitro* und *in vivo* Effekte bei Synucleinopathien wie PD gezeigt werden.

5.1 Chemie der Substanzen

Bei dem Vergleich der Substanz anle138b mit systematischen Variationen im Bezug auf die Wirksamkeit auf die Inhibition der α -Synuclein-Aggregationen ergab sich eine gut definierte Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR=structure-activity relationship).

Die Halogenposition am Benzolring von R3 (siehe Abb. 4a) war äußerst ausschlaggebend. Bromid in der meta-Position hatte den stärksten inhibitorischen Effekt. Änderte man die Lage des Substituenten auf die ortho- oder para- Stellung, war der inhibitorische Effekt eingeschränkt bzw. ging komplett verloren. Saß der Substituent in ortho-Position, änderte sich die räumliche Struktur des Moleküls. Aus sterischen Gründen war das Molekül nicht länger planar (siehe Abb. 4b) und die inhibitorische Wirkung ließ stark nach. Tauschte man Bromid gegen andere Halogene als Substituenten aus, beobachtete man eine Korrelation zu ihrer Größe. In R2 Position besaß Pyrazol die höchste Aktivität, in R1 besaß 1, 3-Benzodioxole die beste Biokompatibilität und inhibitorische Wirkung (87).

Die SAR Analyse für die R1 Position fiel jedoch ungleich schwieriger aus, da Änderungen dort die Biokompatibilität stark beeinträchtigten.

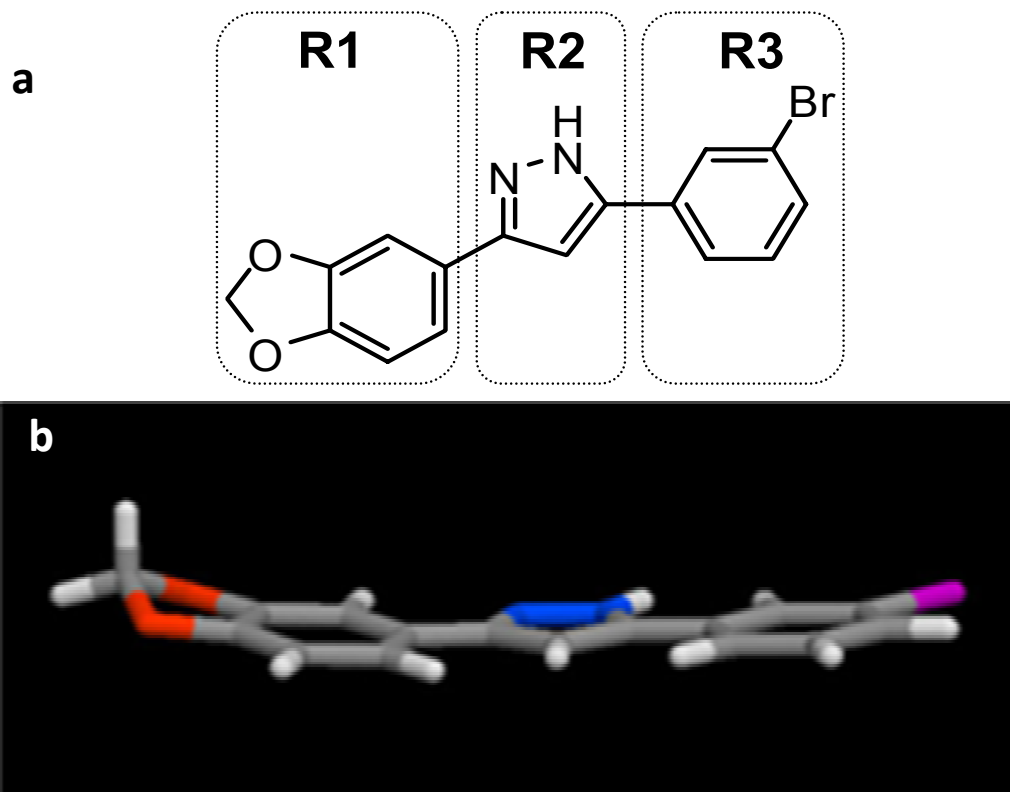


Abb. 4: Grundstrukturformel der im Versuch getesteten Substanzen Beispielhaft ist anle138b dargestellt (87). **a** Die Substituenten an R1 Position beeinflussen im erhöhten Maße die Biokompatibilität, in der Position wurden mit 1, 3-Benzodioxol die besten Ergebnisse erzielt. In R2 Position haben Pyrazole die höchste Aktivität gegen die krankhaften Aggregationen, in R3 Position wurden verschiedene Halogene in verschiedenen Stellungen am Benzolring getestet. **b** Dreidimensionale Struktur von anle138b. Brom in meta-Position zeigt eine hohe inhibitorische Wirkung. Das Molekül ist planar, die Struktur im Raum scheint eine entscheidende Komponente bei der Wirksamkeit zu sein.

Die letztendlich für mein Experiment ausgewählten Substanzen wurden nach Ergebnissen des SIFT-Assay, welches die Inhibition der Aggregation von α -Synuclein in vitro gezeigt hat, sorgfältig ausgewählt. Auch die Wirksamkeit der Präparate bei Prion infizierten Mäusen wurde bei der Auswahl der Substanzen für dieses Tierexperiment berücksichtigt. Da α -Synucleinopathien ähnliche Strukturen und Mechanismen bei der pathologischen Aggregation zeigten wie Prionerkrankungen (99, 100), konnten die aus den vorherigen Versuchen stammenden Substanzen gegen Prionaggregationen auch für meine Versuche übernommen werden. Tatsächlich wurden bedeutende Parallelen in der SAR-Analyse festgestellt.

5.1.1 Anle138b

Die Substanz hat einen 1, 3 Benzodioxole Ring in R1 Position (siehe Tab. 1), der in vitro und in vivo Studien zufolge die höchste Biokompatibilität und höchste Aktivität zeigt. In R2 Position liegt der Pyrazol Ring vor, der in der SAR Analyse ebenfalls die besten Ergebnisse für diese Position erzielt hat, in Kombination mit dem 5'-Phenolring mit Bromid als Substituenten in meta-Position. Das Molekül ist planar und erzielte im SIFT Assay 77% Inhibition der α -Synuclein Aggregation gegenüber der DMSO Behandlung *in vitro*, wobei 10 μ M Substanz verabreicht wurden. Im Prion *in vitro* Test zeigte anle138b 84% Inhibition gegenüber der Aggregation bei RML Prion Stämmen und im Prion Mausmodell 78% Inhibition gegenüber den mit DMSO behandelten Tiere (87). Dabei wurde davon ausgegangen, dass DMSO behandelte Mäusen 0% Inhibition zeigten und die Konzentration der Prionen im Gehirn bei Behandlungsbeginn 100% betrug. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Prionmenge im Gehirn 120 Tage nach der Infektion und nach 40 Tagen Behandlung mit 1 mg Substanz, welche oral in Erdnussbutter gemischt verabreicht wurde. Die Konzentration der Substanz im Gehirn betrug 34,1 nmol/g (siehe Tab. 2), wobei höhere Dosen anle138b zu einem erhöhten Serumspiegel führten und proportional auch die Konzentration im Gehirn anstieg. Durch die gute Penetration von anle138b durch die Blut-Hirn-Schranke lag im Gehirn eine dreifach höhere Konzentration als im Serum vor (87).

Für anle138b als im Moment am meisten untersuchte Substanz, ist zumindest *in vitro* außerdem erwiesen, dass es die Bildung von pathologischen α -Synuclein Oligomeren hemmt, die Ionen permeable Poren in die Lipiddoppelmembran formen und einen neurotoxischen Effekt ausüben (69).

Die *in vivo* Studien haben gezeigt, dass anle138b die Fluktuationen in der Motorik reduziert hat, die Gewichtsentwicklung vergleichbar zu Wildtypmäusen war und die Symptome deutlich später auftraten als bei unbehandelten transgenen Mäusen.

5.1.2 Sery335b

Im Vergleich zu anle138b ist nur der Substituent in R3 Position von Bromid zu Chlorid vertauscht (siehe Tab. 1). In der SAR Analyse zeigten die unterschiedlichen Substituenten in dieser Position eine gaus'schen Verteilung bezüglich der Molekülgröße. So würde man für gegenüber Bromid deutlich größeren oder deutlich kleineren

Molekülen in R3 meta-Position einen geringeren inhibitorischen Effekt erwarten. Für Chlorid als Substituent, wie er bei sery335b vorliegt, wird diese Tendenz in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt.

Im SIFT Assay erzielte sery335b zwar 90% Inhibition gegenüber der α -Synuclein Aggregation, im Prion *in vitro* Test allerdings nur 52% Inhibition und im Prion Mausmodell 68% Inhibition gegenüber DMSO behandelten Tieren (siehe Tab.2). Die Substanz zeigte damit in den Versuchen gegen die Prionaggregationen schlechtere Ergebnisse als anle138b, schien aber für die Inhibition von α -Synuclein Aggregation vielversprechend. Die Konzentration von sery335b im Gehirn betrug 29,6 nmol/g. Die Versuchsbedingungen waren dabei identisch zu denen bei anle138b (87).

5.1.3 Sery383

Bei dieser Substanz blieb im Vergleich zu sery335b die R2 und die R3 Position unverändert (siehe Tab. 1). In R1 Position ist 1,3 Benzodioxole mit Benzolamin substituiert. Das SIFT Assay ergab eine Inhibition von 99% bei der Aggregation von α -Synuclein. Die *in vivo* Tests mit Prion infizierten Mäusen ergaben bei Behandlung mit dieser Substanz eine Inhibition der Prionaggregation von 31% gegenüber die mit DMSO behandelten Gruppe. Auch diese Daten beruhten auf den gleichen Versuchsbedingungen wie bei anle138b (siehe Tab. 2) (87).

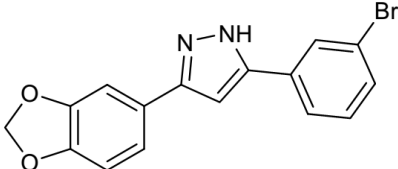
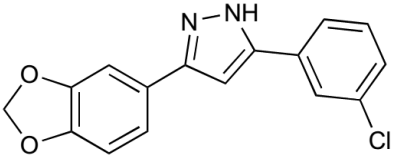
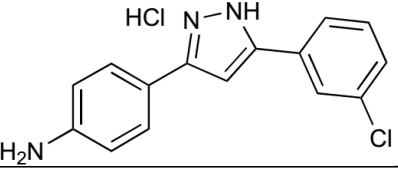
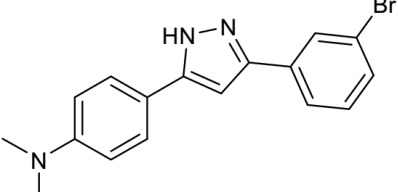
5.1.4 Anle253b

Die Strukturformel von anle253b ähnelt der von anle138b. In R3 Position befindet sich ein Benzolring mit Bromid als Substituenten in meta-Position. In R2 Position Pyrazol, lediglich in R1 Position ist das Molekül verändert (siehe Tab. 1), Anstelle von 1,3 Benzodioxole befindet sich hier Dimeaminbenzol. Die SAR-Analyse ergab bei Modifikationen in dieser Position große Unterschiede in die Bioverfügbarkeit. Dies zeigte sich auch an den schon gemessenen Konzentrationen von anle253b im Gehirn. Mit 2,1 nmol/g erreichte anle253b nur einen Bruchteil der Gehirnkonzentrationen von anle138b (34,1 nmol/g).

Die Inhibition im SIFT Assay für die α -Synuclein Aggregation betrug 50%, im *in vitro* Versuch mit Prion infizierten Zellen 80% und im *in vivo* Experiment mit Prionen 59%

Die Versuchsbedingungen waren dabei identisch zu denen bei anle138b (siehe Tab. 2)(87).

Tab. 1: Chemische Eigenschaften und Strukturformeln aller getesteten Substanzen (87). Die zu testenden Substanzen sind jeweils in einer Position oder einem Substituenten modifiziert. Nur die R2 Position mit Pyrazol bleibt immer unverändert.

Trivialname	Chem. Name	Strukturformel	Molekulargewicht
anle138b	[3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole]		343.0195
sery335b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-chlorophenyl)-1H-pyrazole		299.0587
sery383	3-(4-Aminophenyl)-5-(3-chlorophenyl)-1H-pyrazole hydrochloride		270.0802
anle253b	3-(3-Bromophenyl)-5-[4-(dimethylamino)phenyl]-1H-pyrazole		342.0606

Tab. 2: Wirksamkeit der ausgewählten Substanzen in Vorversuchen (87). a) Inhibition der α -syn Aggregation im SIFT Assay *in vitro* b) Inhibition der Prion Aggregation *in vitro* c) Inhibition der Prion Aggregation *in vivo* in Prion.infizierten Mäusen d) Konzentration der Substanz im Gehirn 4 Stunden nach oraler Einnahme von 1mg Substanz in Erdnussbutter

Substanzen	Inhibition [%]			Konz. Gehirn ^d [nmol/l]
	α -Syn SIFT-Assay ^a	PrP ^{Sc} PMCA ^b	PrP ^{Sc} in vivo ^c	
anle138b	77	84	78	34,1
sery335b	90	52	68	29,6
sery383b	99		31	
anle253b	50	80	59	2,1

6. Zielsetzung

Das Ziel meiner Arbeit ist es, basierend auf Vorbefunden zu anle138b, verschiedene DPP-Derivate hinsichtlich ihrer Wirkstärke auf die Hemmung der α -Synuclein-Aggregation im Vergleich zu anle138b am transgenen Mausmodell zu untersuchen. Insgesamt sollen vier verschiedene Substanzen aus der fokussierten Substanzbibliothek getestet werden. Neben den noch nicht in diesem Modell untersuchten Substanzen, soll das Ergebnis mit anle138b reproduziert werden. Die Behandlung in diesen Gruppen wird vor Ausbruch der Erkrankung, im Alter von 30 Wochen, begonnen.

Die Behandlung einer weiteren Mäusekohorte mit anle138b wird zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns mit 50 Wochen begonnen.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit der Substanzen sind verschiedene Parameter von Bedeutung.

Zum einen wird geprüft, wie die Substanzen generell vertragen werden, indem das Verhalten der zu behandelnden Tiere täglich beobachtet wird.

Zweitens wird basierend auf Vorarbeiten das krankheitsfreie Überleben der transgenen Mäuse untersucht. Dafür wird engmaschig die motorische Fähigkeit und das Gewicht erfasst.

Drittens wird anhand histologischer Daten überprüft, wie sich die Behandlung mit anle138b auf die α -Synuclein-Ablagerung im Gehirn auswirkt. Um die pathologischen α -Synuclein-Aggregation kenntlich zu machen werden die Hirnpräparate mit zwei verschiedenen Färbemethoden behandelt. Die Auswertung erfolgt qualitativ unter dem Mikroskop. So kann der Grad der α -Synuclein-Ablagerung mit dem klinischen Bild der Maus zum Entnahmezeitpunkt verglichen werden.

Letztendlich resultiert die Fragestellung, ob man mit anle138b bzw. seinen Derivaten über die Beeinflussung der toxischen Eigenschaften der α -Synuclein Aggregation den Krankheitsverlauf von PD beeinflussen kann.

C. Material und Methoden

1. Mausmodell

1.1 Genetische Abstammung

Die Versuchstiere waren transgene Mäuse auf einem C57/Bl6 Hintergrund. Sie stammten aus dem etablierten transgenen Mausmodell {(Thy1)-h[A30P] α -syn} (95).

1.2 Transgenes Mausmodell

Als Referenz wurden die behandelten Tiere neben der DMSO-/Placebogruppe mit nicht transgenen C57/Bl6 Mäusen aus Vorversuchen aus der medizinischen Doktorarbeit von Catharina Prix verglichen (87). Das transgene Mausmodell (Thy1)-h[A30P] α -syn zeichnete sich dadurch aus, dass humanes (h) α -Synuclein exprimiert wird (α -syn), das eine pathologische Punktmutation (A30P) aufwies. Der Promotor war Thy1. Nach circa einem Jahr fing das mutierte α -Synuclein an zu aggregieren. Die motorischen Fähigkeiten wurden ab diesem Zeitpunkt zunehmend schlechter (101).

Die Tiere, die für meinen Versuch verwendet wurden, waren ausschließlich weiblich und nach Möglichkeit Wurfgeschwister.

1.3 Versuchsgruppen

In vier Gruppen á 15 Individuen testete ich die Substanzen anle138b, sery335b, sery383 und anle253b.

Um für den therapeutischen Gebrauch am Menschen sinnvoll zu sein, sollte ein Medikament auch nach Eintreten der ersten Symptome wirksam sein. Daher wurde eine Kohorte von Mäusen erst ab der 50. Woche, etwa der Zeitraum, in dem erste klinische Symptome beobachtet werden, mit anle138b gefüttert (siehe Abb. 5).

Als Vergleichsgruppe für alle vorher genannten Gruppen gab es eine Placebogruppe. Insgesamt bestand mein Experiment dementsprechend aus sechs Gruppen á 15 Tiere; erstens einer Placebogruppe, zweitens einer Gruppe die mit der Substanz anle138b ab der 30. Woche behandelt wurde, drittens einer Gruppe, die mit der Substanz anle138b ab der 50. Woche behandelt wurde, viertens einer Gruppe die mit der Substanz

sery335b ab der 30. Woche behandelt wurde, fünftens einer Gruppe die mit der Substanz sery383 ab der 30. Woche behandelt wurde und sechstens einer Gruppe, die mit der Substanz anle253b ab der 30. Woche behandelt wurde.

Die Substanzen wurden jeweils mit Erdnussbutter gemischt. So wurde gewährleistet, dass die Tiere die Substanzen sicher zu sich nahmen. Außerdem wurden die lipophilen Substanzen bei der Gabe mit Erdnussbutter als Medium langsamer resorbiert und waren länger bioverfügbar. Dies zeigte sich im Vergleich zu anderen Applikationsformen zum Beispiel der intraperitonealen Gabe oder der oralen Gabe mit Olivenöl (87).

Jeden Tag wurden die Tiere beobachtet, um Auffälligkeiten in ihrem Verhalten zu detektieren. Qualitative Messungen der motorischen Fähigkeiten und des Gewichtes wurden im Abstand von zwei Wochen durchgeführt. Nach dem Ableben wurde das Gehirn, das Rückenmark und die inneren Organe histologisch aufbereitet und mikroskopisch untersucht.

In jeder der sechs Gruppen wurden im Vorhinein fünf Tiere, die möglichst aus einem Wurf stammten, festgelegt und nach 69 Lebenswochen aus dem Experiment entnommen. Mussten die Tiere vor der 69. Lebenswoche wegen Krankheitszeichen aus dem Experiment genommen werden, wurden sie nicht ersetzt. Diese Mäuse dienten dem Vergleich des Krankheitsfortschritts zu einem vorher determinierten Zeitpunkt zwischen den Gruppen. Dieser Vergleich war vor allem bei der histologischen Auswertung von großer Aussagekraft.

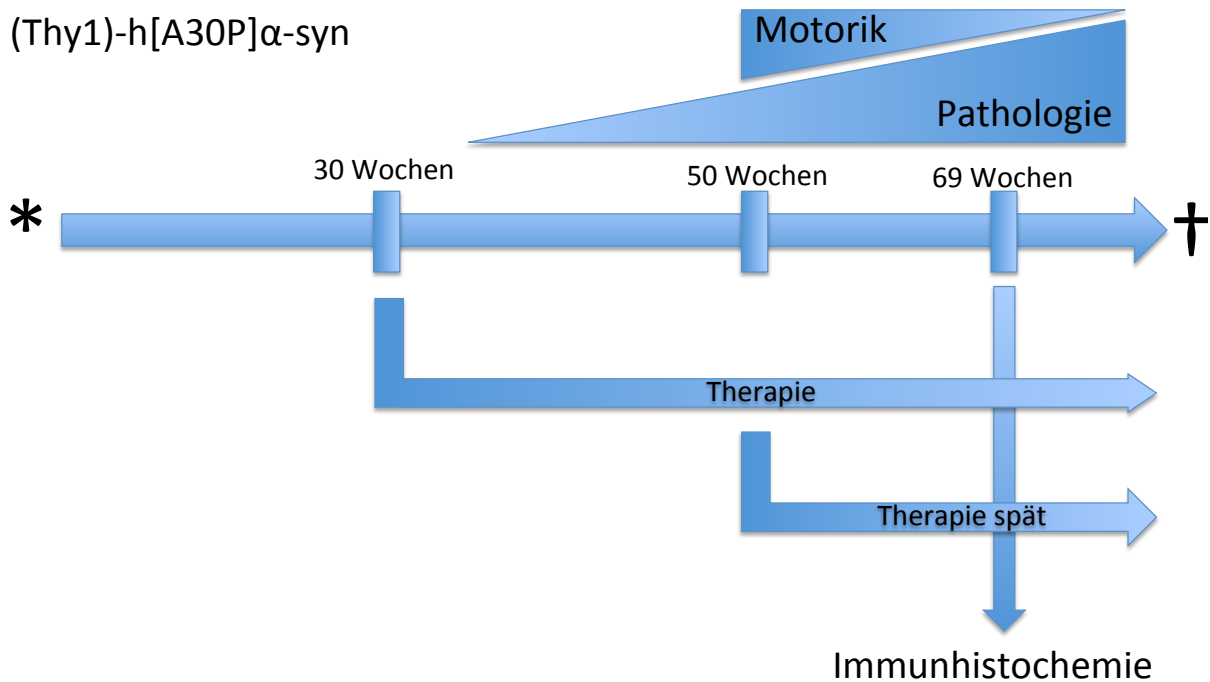


Abb. 5: Behandlungsplan. Die Therapie begann in vier von fünf Substanzgruppen ab der 30. Lebenswoche, bei einer Gruppe erst ab der 50. Lebenswoche. Mit 69 Wochen wurden vorherbestimmte Tiere zur immunhistochemischen Untersuchung aus dem Experiment entnommen. Ab circa der 50. Lebenswoche der transgenen Mäuse sah man klinisch eine Verschlechterung der Motorik und eine Zunahme der Pathologie in den histologischen Schnitten.

1.4 Tierfütterung

Die Mäuse wurden in der 30. Lebenswoche mit den Substanzen bzw. DMSO angefüttert (siehe Abb. 5). Die Substanzen wurden in DMSO gelöst und mit Erdnussbutter (Barney's best creamy peanut butter, Dockhorn & Co, Hamburg, Germany) gemischt. Drei Tage vor der Erstgabe der Substanzen bekamen die Mäuse zweimal täglich die Dosis von 200 μ l Erdnussbutter zur Gewöhnung an das Nahrungsmittel.

Nach der Gewöhnungsphase an die Erdnussbutter wurde jeweils 5 mg Substanz in 10 μ l DMSO/200 μ l Erdnussbutter gelöst und die Tiere wurden damit zweimal täglich gefüttert.

Die Gruppe, die durch den Behandlungsstart ab der 50. Lebenswoche charakterisiert war, wurde ab der 30. Woche mit zwei Tagesdosen je 200 μ l Erdnussbutter mit 10 μ l DMSO gefüttert; ab der 50. Woche mit 5 mg anle138b in 10 μ l DMSO/200 μ l Erdnussbutter ebenfalls zweimal täglich.

Die Mäuse bekamen zusätzlich jeden Tag frisches Wasser (Schnittwasser aus Leitungswasser und VE-Wasser bzw. nach dem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore,

MA, USA) aufbereitetes Wasser=Millipore), das in den Trinkflaschen in den Tierhaltungsbereich autoklaviert wurde und Trockenfutter (Haltungsfutter V 1536, Sniff) ad libitum.

1.5 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden in spezifisch pathogenfreier Tierhaltung (SPF) im geschlossenem IVC Barrierensystem (individual ventilated cages) gemäß der Tierschutz- und -haltungsrichtlinien gehalten. Der Tierhaltungsbereich war über mehrere Schleusen zu betreten. Ausschließlich befugte Mitarbeiter dürften diesen, nach vorherigem Duschen und Umkleiden, betreten. Materialschleuse und Durchreicheautoklaven verhinderten eine Pathogenverschleppung auf diesem Weg. Die Überdruckbelüftung, die je nach Außenwelt für einen um ca. 50 Pa höheren Luftdruck im SPF Bereich sorgt, gewährleistete, dass beim Öffnen der Schleusen von Außen keine Keime in den Bereich eindringen konnten.

Die Mausekäfige wurden einmal wöchentlich ausgeschleust, in einer Waschstraße gespült, getrocknet, mit frischem Einstreu und Nestmaterial bestückt und anschließend wieder in den Tierhaltungsbereich autoklaviert. Die Autoklaventemperatur betrug 121°C.

Die hohen hygienischen Anforderungen sorgten dafür, dass die transgenen Tiere nicht mit Krankheitserregern angesteckt wurden, die das Ergebnis verfälschen hätten können. Der SPF Status der Tiere wurde regelmäßig mit Hilfe von Sentinel Mäusen überprüft und wurde nach den FELASA Empfehlungen (Federation of Laboratory Animal Science Associations) durchgeführt.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen (Typ MII, verlängert) mit je einer Maus pro Käfig. Die Tiere wurden ab Geburt einmal täglich durch entsprechend geschultes Fachpersonal überwacht.

Die Tiere lebten in einem konstanten Licht/Dunkel Rhythmus von 12h/12h.

Alle Tierexperimente wurden gemäß des National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals des sächsischen Komitees für Tierexperimente, Dresden, durchgeführt.

2. Messungen mit dem RotaRod

2.1 Das RotaRod

Der klinische Krankheitsfortschritt der Versuchstiere wurde mithilfe des RotaRod anhand der motorischen Fähigkeiten der Tiere überwacht und quantifiziert (siehe Abb. 6). Hierzu wurde ein RotaRod für 5 Tiere V4.1.1 (TSE Systems Chesterfield, MO, USA) verwendet.

Das RotaRod ist eine rotierende Walze, die im Laufe einer festgelegten Zeit beschleunigt. Die Walze ist in 5 identische Abschnitte eingeteilt und etwa 10 cm über dem Käfigboden befestigt. In jedem Abschnitt kann eine Maus auf die Walze gesetzt werden. Der Käfigboden ist mit Lichtschranken versehen, die messen, nach welcher Zeit auf der Walze ein Tier auf den Boden herunterfällt. Die RotaRod Walze ist mit einem Computer verbunden, der mit dem entsprechenden Programm die Laufzeiten der Mäuse, die über die Lichtschranken gemessen werden, aufzeichnet. Die Walze kann man durch eine Programmierung unterschiedlich schnell und unterschiedlich lang laufen lassen. Die Tiere mussten auf dieser Walze laufen, durch die Beschleunigung wurde das Herunterfallen forciert. Je kränker die Tiere wurden, desto schneller fielen sie von der Walze. Dadurch war es möglich, den Krankheitsverlauf am lebenden Tier zu messen.



Abb. 6: TSE RotaRod System ((102) mit freundlicher Genehmigung von TSE Systems GmbH, Siemensstr. 21, 61352 Bad Homburg v.d.H., Deutschland). Auf der rotierenden Walze liefen in dem hier dargestellten Experiment jeweils drei Mäuse auf einmal, um ihre motorischen Fähigkeiten zu überwachen. Die Drehgeschwindigkeit und die Beschleunigung der Walze wurden vor Versuchsbeginn festgelegt und beibehalten. Jedes Abteil wurde durch eine eigene Lichtschranke kontrolliert, die den Zeitpunkt erfasste, an dem die Mäuse von der Walze fielen. Mit der dazugehörigen Software wurden die Laufzeiten der Mäuse, über den mit dem RotaRod verbundenen Computer, aufgezeichnet.

Ab der 42. Lebenswoche (siehe Abb. 7), was etwa dem Alter entspricht, an dem erste motorische Symptome auftreten (87), wurden die Tiere jede zweite Wochen an zwei hintereinander folgenden Tagen trainiert. Dafür liefen sie auf der sich drehenden Walze, am dritten darauffolgenden Tag wurde der Test durchgeführt, dessen Messwerte in die Statistiken einfluss. Bei den Trainingsläufen steigerte sich die Geschwindigkeit der RotaRod Walze in 180s von 0 auf 30 Runden pro Minute (rpm), am Testtag lief der RotaRod 300s mit eine kontinuierlichen Steigerung der Geschwindigkeit von 0 auf 50 rpm, dies entsprach der gleichen Beschleunigung wie an den Trainingstagen.

Jede Maus sollte an jeden der drei Tage drei gültige Läufe absolvieren. Zwischen jedem Lauf, wurde eine Regenerationszeit von mindestens 40s eingehalten, bevor die Maus erneut auf die Walze gesetzt wurde. Sobald sich eine Maus weniger als 10 s auf der sich bewegendenden Walze hielt, war der Lauf ungültig und wurde bis zu maximal dreimal wiederholt. Das terminale Entnahmekriterium der Mäuse war erfüllt, wenn ein Tier in sechs Läufen, keine drei gültigen Läufe absolvieren konnte, von denen mindestens einer über 20s dauerte. In solch einem Fall wurde davon ausgegangen, dass die motorischen Fähigkeiten soweit eingeschränkt waren, dass die Krankheit im terminalen Stadium war. Die Kriterien für die RotaRod Messungen wurden derartig festgelegt, da es den Kriterien der bisherigen Versuche mit transgenen Mäusen {(Thy1)-h[A30P] α -syn} entsprach und damit eine Vergleichbarkeit zu anderen Versuchen gewährleistet war (87).

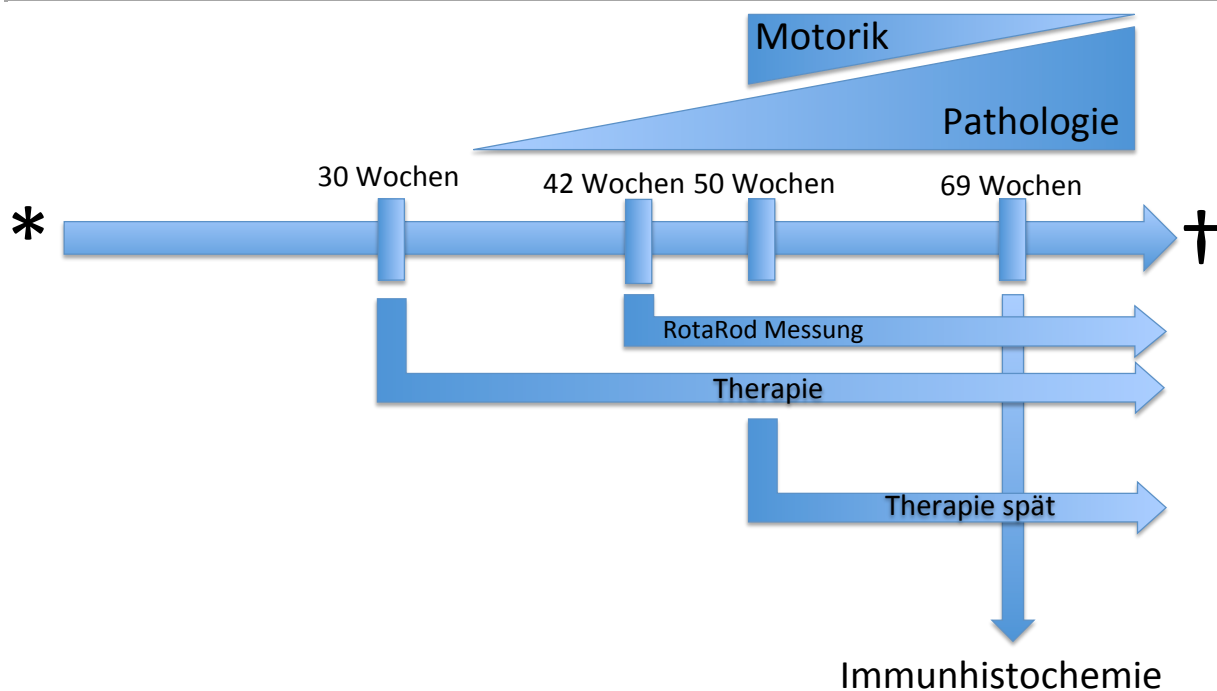


Abb. 7: Behandlungs- und Messplan. Ab der 42. Woche wurden die motorischen Fähigkeiten der Mäuse mithilfe des RotaRod gemessen. Rhythmus von zwei Wochen liefen die Tiere jeweils drei Tage hintereinander auf dem RotaRod.

Als zweiter klinischer Parameter wurde das Gewicht der Tiere mit einer Sartorius Präzisionswaage CPA2202S immer am zweiten der drei Messtage ermittelt.

Der Allgemeinzustand, der unter anderem an der Beschaffenheit des Fells und der Beweglichkeit der Maus abzulesen war, wurde jeden Tag beurteilt. An den Messtagen wurde noch einmal ein besonderes Augenmerk darauf gelegt.

Die drei Tage des Trainings bzw. des Tests wurden am Anfang des Experiments auf Mittwoch, Donnerstag und Freitag festgelegt und während des laufenden Experiments nicht verändert. Die Messtage wurden so gewählt, dass die Mäuse am Wochenende immer Ruhephasen hatten und nicht durch andere Arbeiten im Tierstall erschreckt, unruhig oder aufmerksam gemacht wurden. Es wurde darauf geachtet, dass die Tageszeiten des Messens über die Dauer des Experimentes nicht wesentlich variierten, um Schwankungen auszuschließen, die auf unterschiedliche Tageszeiten des Messens zurückzuführen sind. Grundsätzlich wurde nicht in den Dunkelphasen des 24 h Rhythmus gemessen. Es wurde darauf geachtet die exogenen Faktoren, die die Laufleistungen beeinflussen könnten so klein wie möglich zuhalten.

2.2 Erhebung der Messdaten

Von den drei erhobenen Laufzeiten der Mäuse am Testtag wurde jeweils der Mittelwert gebildet und zusätzlich die Beste der drei Zeiten notiert. Für die weitere Auswertung wurde nur der sogenannte „best of three-Wert“ herangezogen. Die Fokussierung auf diesen Messwert erfolgte wiederum um eine Vergleichbarkeit mit den Vorversuchen herzustellen. Hier wurde der Beste der drei Werte dem Mittelwert zur Auswertung vorgezogen, da es sich um eine reelle Laufzeit handelt.

Somit wurde auch in meinem Experiment der beste Wert über den Zeitraum von der 42. bis 50. Woche auf die in der Zeit durchschnittliche Leistung (Baseline) normiert. Die Bildung der Baseline über die ersten acht Wochen war notwendig, da sich bei vorhergehenden Tierversuchen, die nach dem gleichen Schema durchgeführt wurden, gezeigt hatte, dass die Laufzeiten starken intraindividuellen Schwankungen unterlagen (87).

Die Tiere, die terminal aus dem Experiment ausschieden, wurden in den folgenden Wochen mit 0 s (Sekunden) Laufleistung gewertet.

Die Tiere, deren Entnahme vorher auf die 69. Woche terminiert war, wurden nach ihrem Tod in den Tabellen ohne Wert geführt. Ausnahme davon waren die Tiere, die schon vor der 69. Woche klinisch das terminale Ausscheidkriterium erfüllten. Sie wurden, wie alle anderen terminal entnommenen Mäuse, in den folgenden Wochen mit 0 s Laufleistung geführt.

3. Entnahme der Versuchstiere

Erfüllte eine Maus die terminalen Kriterien während der Messwoche, wurde sie an deren Ende aus dem Experiment entnommen und durch zervikale Dislokation getötet.

Die Tiere wurden anschließend sofort präpariert. Die Tiere, die zwischen den Messwochen von dem entsprechenden Fachpersonal als terminal erkrankt erkannt wurden, wurden am selben Tag aus dem Experiment entnommen und präpariert. Die Mäuse, die vorherbestimmt in der 69. Lebenswoche das Experiment verlassen sollten, wurden jeweils am Ende der Messwochen entnommen. Ihr Todesdatum ist dadurch nicht immer genau auf einen Tag in ihrer 69. Lebenswochen gefallen, sondern ergab sich durch den letzten Testtag in der Wochen, in der die Tiere die 69. Lebenswoche erreicht hatten.

4. Präparation

Die Präparation wurde mit einem festgelegten Präparationsbesteck (FST, Heidelberg) vorgenommen.

Mit der immer gleichen Methode und Vorgehensweise wurde das Tier präpariert. Es wurden nacheinander der Kopf inklusive dem Gehirn entnommen, die inneren Organe vom Rektum bis zu Herz und der Lunge als ein Präparat fixiert, die Wirbelsäule wurde komplett als drittes Präparat entnommen. Jedes der drei Präparate wurde einzeln in ein formalingefülltes 50ml-Zentrifugationsröhrchen gegeben und vor der histologischen Aufarbeitung eine Woche bei Raumtemperatur fixiert, bevor es eingebettet und geschnitten wurde.

6. Histologische Untersuchungen

Die Herstellung der histologischen Schnitte wurde unter Anleitung und tatkräftiger Unterstützung von Herrn Michael Schmidt vorgenommen. Die verschiedenen Organe wurden mit unterschiedlichen Färbemethoden bearbeitet.

Die Präparate wurden zunächst in Paraffin eingebettet, mit 0,2 M Borsäure bei pH 9 und 63°C für 25 min behandelt und anschließend im selben Medium für weitere 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Präparate in 1µm dicke Scheiben geschnitten.

Die inneren Organe wie die Milz, die Nieren, das Herz, die Lunge und der Darm wurden dann mit Millipore abgewaschen und mit HE (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) gefärbt.

Zur Färbung von α -Synuclein wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Beide Färbetechniken beruhten auf der Markierung von α -Synuclein im Gehirn mit einem Antikörper.

Alle Gehirnschnitte wurden zunächst mit dem anti-humanen α -Synuclein Antikörper 15G7 behandelt (95). Da dieser Antikörper an humanes α -Synuclein als Monomer und als Aggregat bindet, musste das Gewebe, um nur die α -Synuclein Aggregate zu markieren vor der Behandlung der Schnitte mit 15G7 mit Proteinase K vorbehandelt werden. Diese Proteinase verdaut das als Monomer vorliegende α -Synuclein. Die α -Synuclein Aggregate werden dagegen nicht vollständig verdaut. Bei der darauffolgenden Färbung mit dem Antikörper wurden nur die Aggregate markiert. Für die

Vorbehandlung mit dem Proteinaseverdau wurden 50mg/ml einer Proteinase K (PK) Stammlösung im Verhältnis 1:500 mit Verdaupuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 + 100 mM NaCl + 0.1% BRIJ35) verdünnt, wobei die PK Lösung 10 min bei 37° C vorbehandelt wurde. Danach wurden die histologischen Präparate gewaschen und für 32 min in eine 1:4000 verdünnte 15G7 Lösung gegeben. Zum Schutz wurden die Schnitte mit DAB (3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid) behandelt und mit Wasser abgewaschen (87).

Die Mäuse, die vorherbestimmt im Alter von 69 Wochen aus dem Experiment entnommen wurden, dienten zum Vergleich der Histologie in der frühen Krankheitsphase. Dafür wurden die Gehirnschnitte dieser Tiere mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuclein behandelt. Dieser kann ohne Vorbehandlung angewendet werden und greift vor allem phosphorylierte Proteine an. Da die pathologischen α -Synuclein Aggregate vermehrt phosphoryliert sind, werden sie durch den Antikörper gefärbt und so auf dem histologischen Schnitt sichtbar gemacht (siehe Abb. 8).

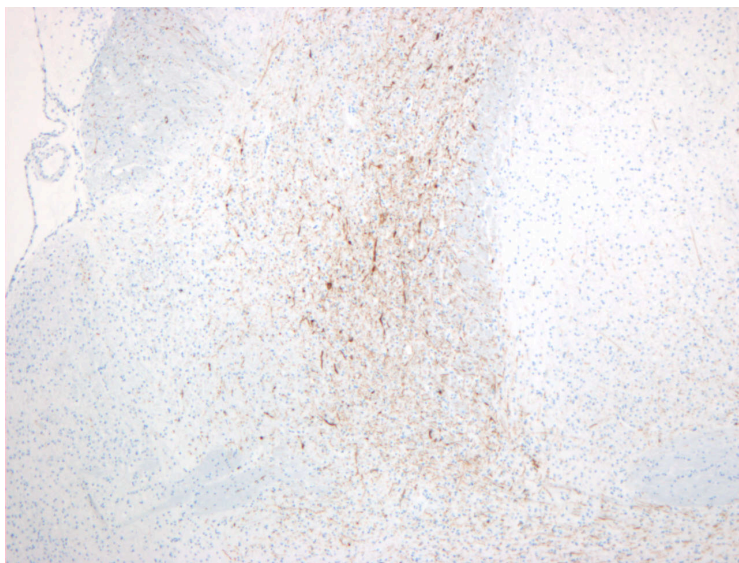


Abb. 8: Immunhistochemie mit dem Antikörper 15G7.

Das Mittelhirn einer erkrankten Maus in vierfacher Vergrößerung. Die vermehrt phosphorylierten α -Synuclein Aggregate wurden durch die Verbindung mit dem Antikörper braun gefärbt. Areale in denen keine Aggregation vorhanden war, wurden nicht durch den Antikörper gefärbt.

6. Histologisch Auswertung

Zur Auswertung der histologischen Schnitte wurde zunächst deren Qualität bewertet. Gestaffelt in drei Qualitäten entweder mit gar keinem störenden Hintergrund, mit wenig störendem Hintergrund oder mit viel störendem Hintergrund wurden die Bilder eingeordnet. So konnte gewährleistet werden, dass bei der späteren Bewertung des

Grades der α -Synuclein Ablagerung keine Fehler aufgrund des unterschiedlichen Hintergrunds passierten.

Für die Beurteilung der Ausprägung der α -Synuclein Aggregationen im Gehirn wurde ein Bewertungsschema festgelegt. Je nach Dichte der Aggregation wurden die Schnitte mit Grad 1 für sehr wenig α -Synuclein Ablagerungen, mit Grad zwei für deutliche Ablagerungen und mit Grad 3 für sehr viele Ablagerungen bewertet.

Neben den Hirnschnitten wurden auch die Schnittbilder der inneren Organe, vor allem der Milz und der Niere genauer betrachtet. Für die beiden genannten Organe war aus Vorversuchen bekannt, dass dort Pathologien auftreten könnten. Diese betrafen insbesondere das Gefäßsystem, sodass die Struktur der beiden sehr gut durchbluteten Organe, Milz und Niere, komplett verloren gehen konnten. Die Analyse der Pathologie wurde rein qualitativ durchgeführt, indem eine Ja-Nein-Entscheidung getroffen wurde, ob die Organe gesund sind oder nicht. Für jede Versuchsgruppe wurde dann eine Statistik erstellt wie viele Tiere eine Erkrankung der inneren Organe entwickelt hatten.

D. Ergebnisse

1. Laufleistungen der Versuchstiere

Die folgenden Diagramme stellen die RotaRod Performance über die gesamte Lebenszeit der Mäuse im Experimente für die jeweilige Versuchsgruppe dar. Dabei werden zwei verschiedene Auswertungen gewählt. Zum einen werden die absoluten Laufzeiten der Mäuse in Sekunden gezeigt. Zum anderen wird für jedes Tier eine Baseline errechnet, die durch die Messergebnisse der ersten vier Messtermine ermittelt wird (42. bis 51. Lebenswoche). Alle weiteren Werte werden in Bezug zu dieser Baseline gesetzt. Die Unterschiede, die aufgrund der verschiedenen Baselinelaufleistungen der Mäuse zustande kommen, werden bei dieser Darstellung aufgehoben.

Die Laufleistungen der einzelnen Tiere werden über die Zeit dargestellt.

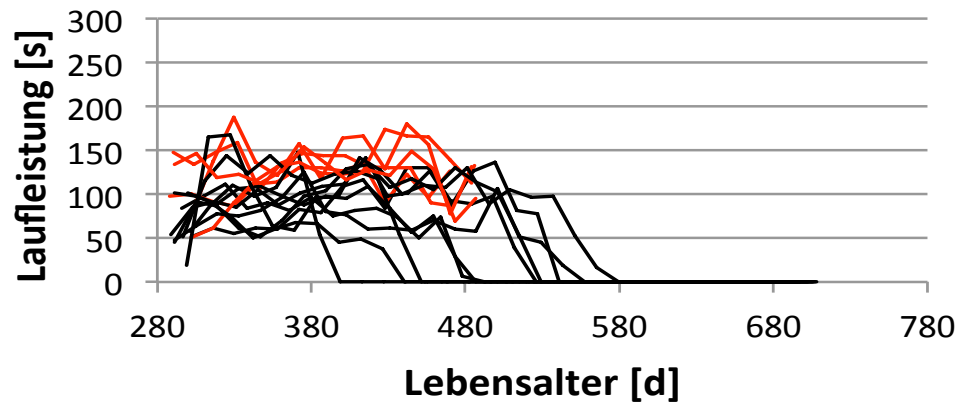
Jede schwarze Linie stellt ein Tier dar, das terminal aus dem Experiment ausgeschieden ist. Nach der Entnahme wurden ihre Laufleistungen mit 0 Sekunden bewertet.

Die roten Linien markieren Tiere, die geplant zum Zeitpunkt 69 Wochen entnommen wurden. Für diese Tiere wurde für die folgenden Wochen kein Wert geführt.

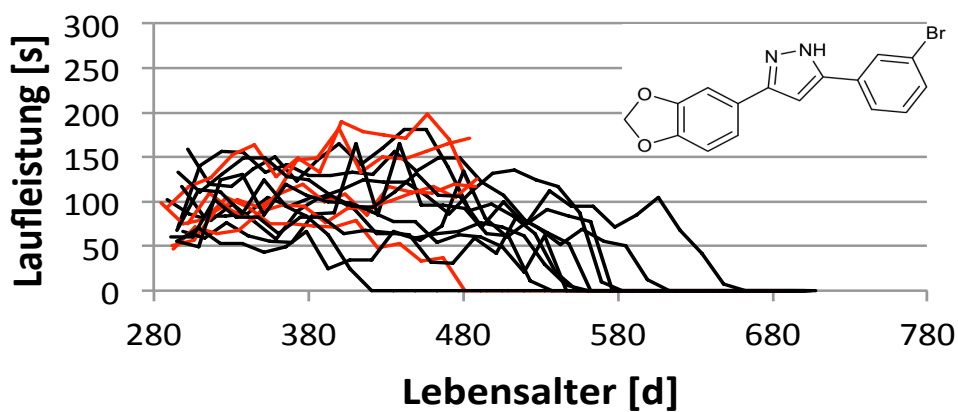
Die in 2.3 beschriebene Tiergruppe, die keine Substanz bekam, wird im folgenden Ergebnisteil als Placebogruppe bezeichnet.

1.1 Absolute Laufleistungen der Versuchstiere

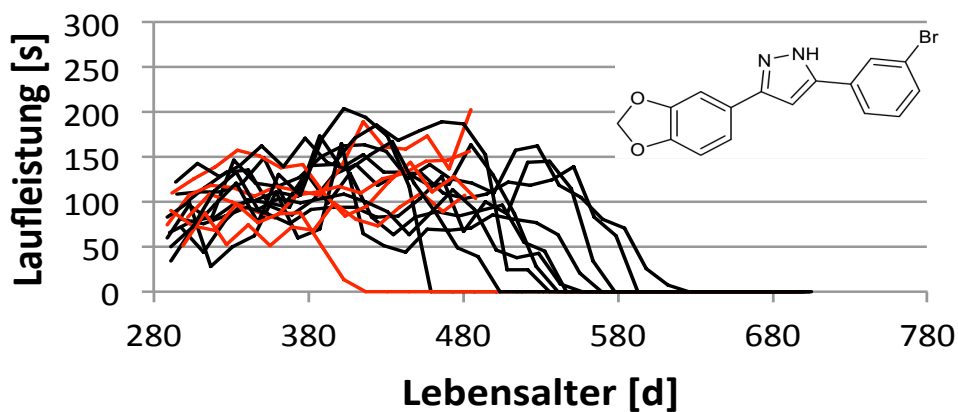
a)

Placebo

b)

anle138b ab Woche 30

c)

anle138b ab Woche 50

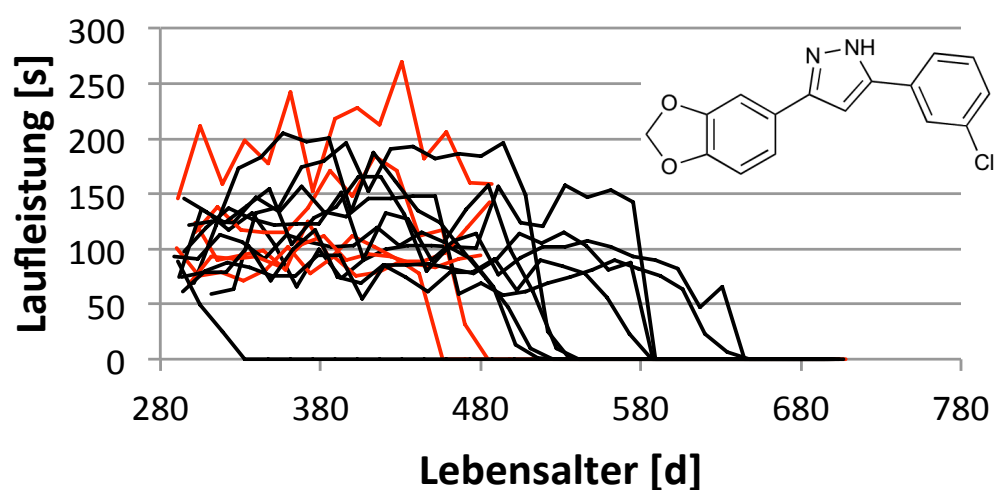
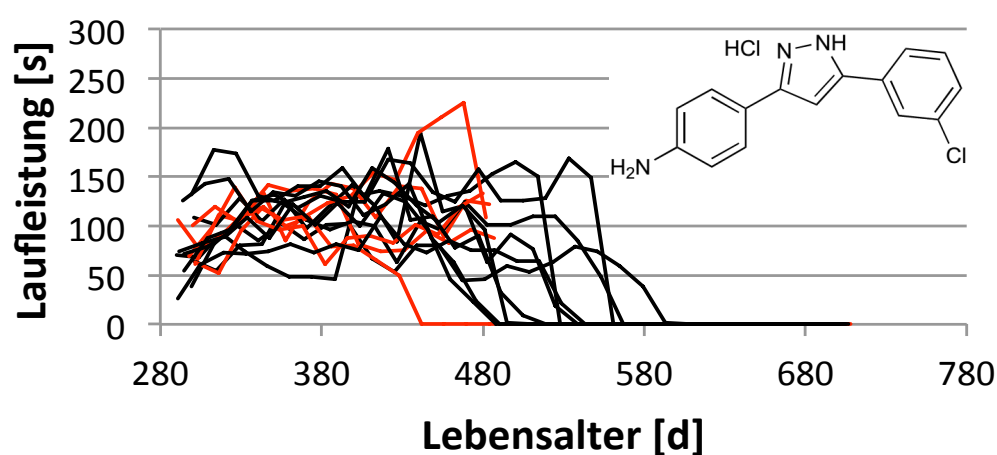
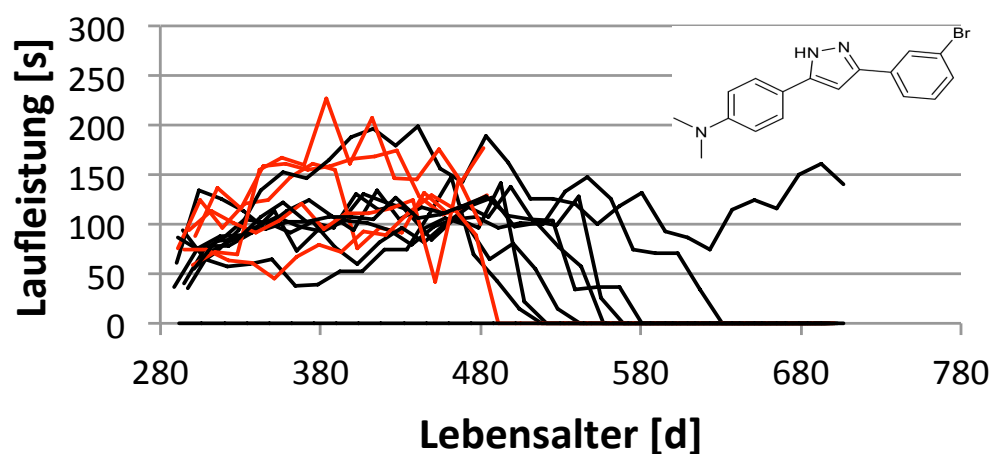
d) **sery335b ab Woche 30**e) **sery383 ab Woche 30**f) **anle253b ab Woche 30**

Abb. 9: Absolute Laufleistung der Mäuse auf dem RotaRod pro Versuchsgruppe. Jede Linie stellt ein Tier dar. Sie zeigen die jeweilige Zeit, die eine Maus am Messtag auf dem RotaRod gelaufen ist. Die Zeit ist gegen das Lebensalter der Mäuse am Messtag aufgetragen. Die schwarzen Linien stehen für die Tiere, die solange im Versuch erfasst wurden, bis sie ihrer Krankheit erlegen sind. Die roten Linien stehen für Tiere, die designiert nach 69 Wochen aus dem Experiment entnommen wurden. Abb. **a)** Placebokontrollgruppe **b)** anle138b mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche **c)** anle138b mit Fütterung ab der 50. Lebenswoche **d)** sery335b mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche **e)** sery383 mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche **f)** anle253b mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche

Bei der Auswertung der Diagramme wurden drei verschiedene Parameter bewertet. Erstens ging es um die Laufleistungen der Tiere, zweitens um die Überlebensdauer und drittens um die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression. Im Folgenden wurden alle drei Aspekte der Reihe nach im Gruppenvergleich betrachtet.

Beim Vergleich der absoluten Laufleistungen der Mäuse in den verschiedenen Gruppen gab es einige Unterschiede. So fiel auf, dass die Tiere der Placebogruppe, die nur das Lösemittel erhielten, mit Abstand am kürzesten auf dem RotaRod liefen. Es gab kein Tier, das länger als 200 s lief, in der Spitze wurden 180s erreicht.

Zunächst sollen die absoluten Werte der Laufleistungen der Mäuse verglichen werden. Darauf folgen die normierten Werte.

Die beiden Tiergruppen, die mit anle138b ab der 30. Woche bzw. ab der 50. Woche gefüttert wurden, liefen maximal 200 s auf dem beschleunigten RotaRod, das dann eine Geschwindigkeit von circa 33,2 rpm erreichte. In der Gruppe mit Substanzgabe ab der 50. Lebenswoche erreichten mehrere Tiere diese Spitzenleistung (siehe Abb. 9c).

In allen drei anderen Substanzgruppen wurden jeweils Laufleistungen über 200 s erreicht.

In der sery335b Gruppe lief ein Tier über 250s und im Gruppenvergleich liefen in dieser Gruppe die meisten Tiere zwischen 150 und 200s. Die durchschnittliche Laufleistung betrug in allen Gruppen zwischen 50 und 150s (siehe Abb. 9d).

Diese Zeiten waren bei den meisten Gruppen über die Lebenszeit der Tiere konstant. Lediglich bei der Gruppe, die mit anle138b ab der 50. Woche behandelt wurde, sah man eine leichte Leistungssteigerung circa ab dem 320. Lebenstag mit dem Maximum am 400. Lebenstag (siehe Abb. 9c). Ebenfalls eine geringe Steigerung in den Laufleistungen zeigte die anle253b Gruppe, wobei in dieser Gruppe mehr Fluktuationen nach oben und

unten auftraten (siehe Abb. 9f). Die Leistungszunahme begann ähnlich wie in der anle138b Gruppe am 320. Lebenstag und hatte ihr Maximum circa am 420. Lebenstag.

Die sery335b Gruppe hatte als einzige Gruppe leicht erhöhte Laufzeiten gegenüber den anderen Versuchsgruppen (siehe Abb. 9d) Die Laufleistungen der meisten Tiere lagen zwischen 75 und 150s.

Beachtenswert war im Hinblick auf die Interpretation der Ergebnisse der Vergleich der beiden anle138b Gruppen. Das Leistungsmaximum war in beiden Gruppen mit 200s identisch.

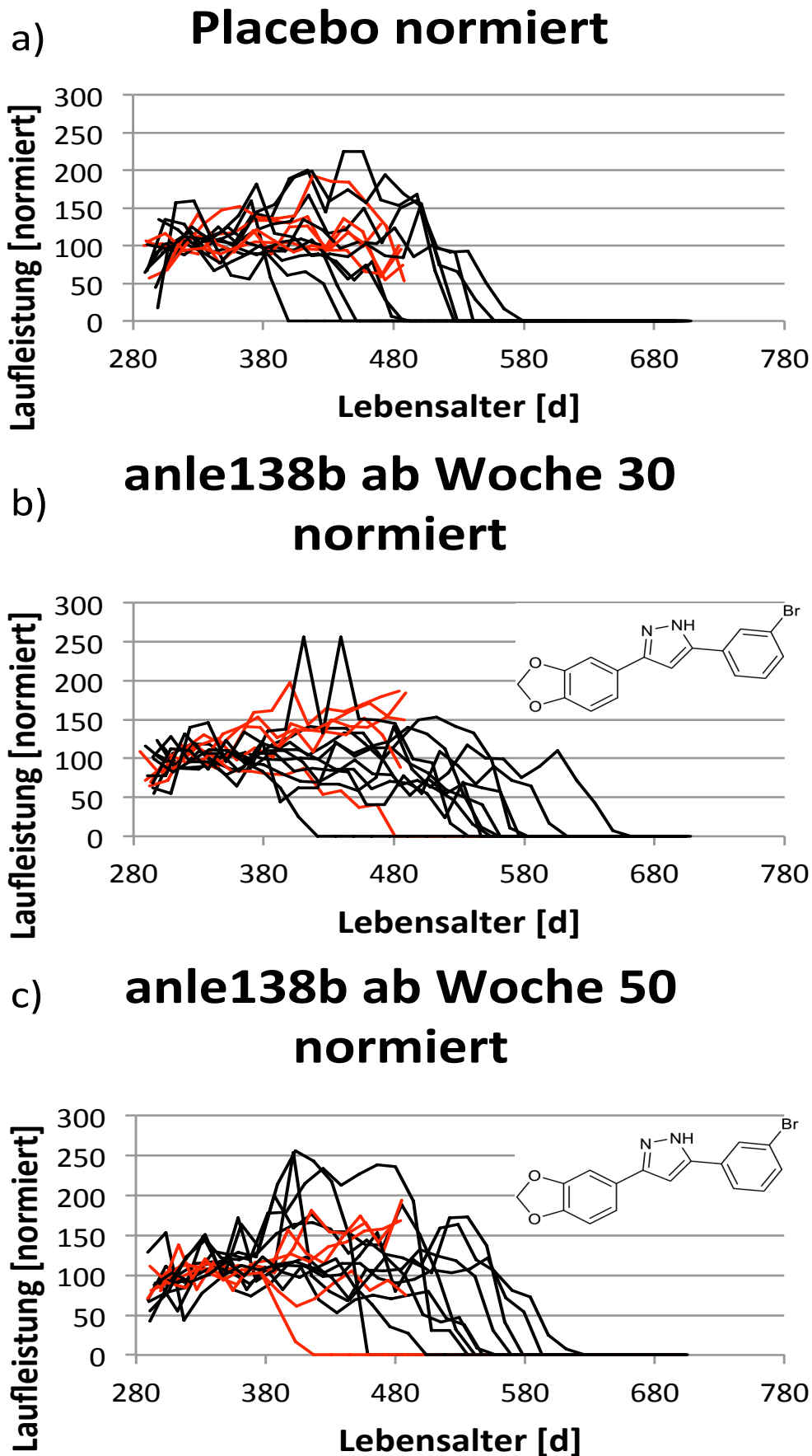
Bei dem zweiten Parameter, der Überlebensdauer der Tiere, zeigte sich, dass die Placebogruppe die kürzesten Überlebenszeiten aufwies. Der Zeitraum, in dem alle Tiere terminal das Experiment verließen, lag zwischen dem 399. und dem 571. Tag. Bei allen Gruppen, die eine Substanz bekamen, war sowohl die erste Maus, die das Experiment terminal verließ, als auch die letzte Maus, die starb älter als in der Placebogruppe. Durchschnittlich verließen die Tiere in den Substanzgruppen das Experiment zwischen dem 420. und dem 620. Lebenstag. Besonderes hervorzuheben ist die anle253b Gruppe, in der die Tiere sehr alt wurden. Die erste Maus wurde an ihrem 488. Lebenstag terminal entnommen, die älteste Maus wurde 707 Tage alt (siehe Abb. 9f).

Der kürzeste Zeitraum, in dem Tiere das Experiment terminal verließen, lag bei der sery383 Gruppe vor und betrug lediglich 152 Tage (siehe Abb. 9e).

Betrachtet man wieder die beiden anle138b Gruppen, so fallen große Ähnlichkeiten auf. Beginn, Ende und Zeitraum der Tierentnahme waren ähnlich. Das erste Tier wurde in beiden Gruppen im Alter von circa 400 Tagen entnommen, das Letzte mit 646 Tagen (anle138b ab 30 Wochen) bzw. mit 616 Tagen (anle138b ab 50 Wochen). Der Zeitraum in dem die Tiere lebten betrug 246 Tagen für erstere Gruppe und 216 Tage für die letztere Gruppe.

Die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression war nahezu in allen Gruppen gleich. Die meisten Tiere starben nach dem ersten Einbruch in der Laufleistung innerhalb von 20-30 Tagen. Dies ist deutlich sichtbar an den steil zur x-Achse abfallenden Linien, die für fast alle Mäuse und in allen Gruppen zu erkennen sind.

1.2 Relative Laufleistungen der Versuchstiere



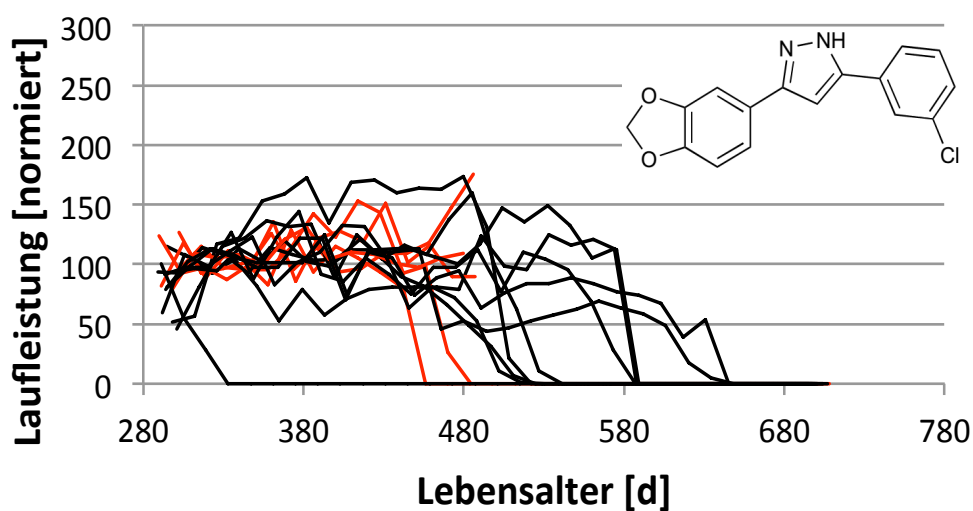
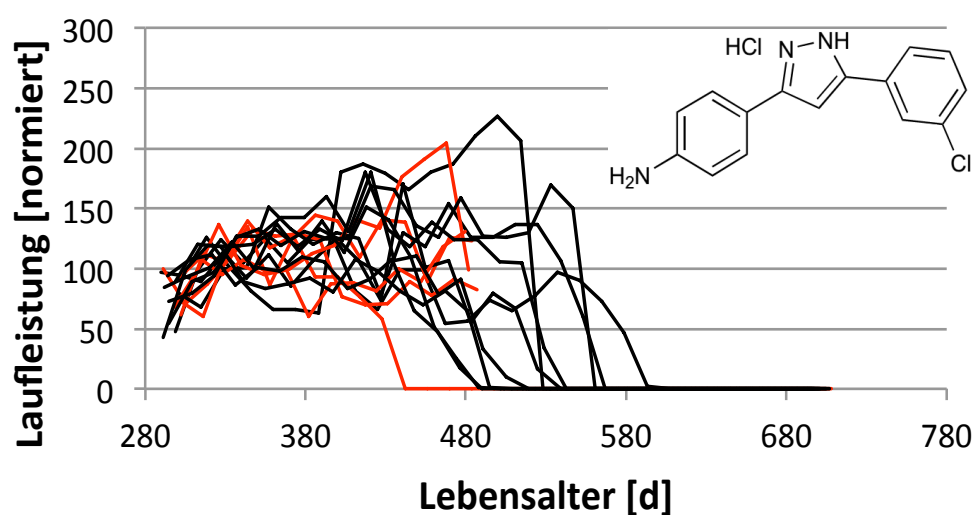
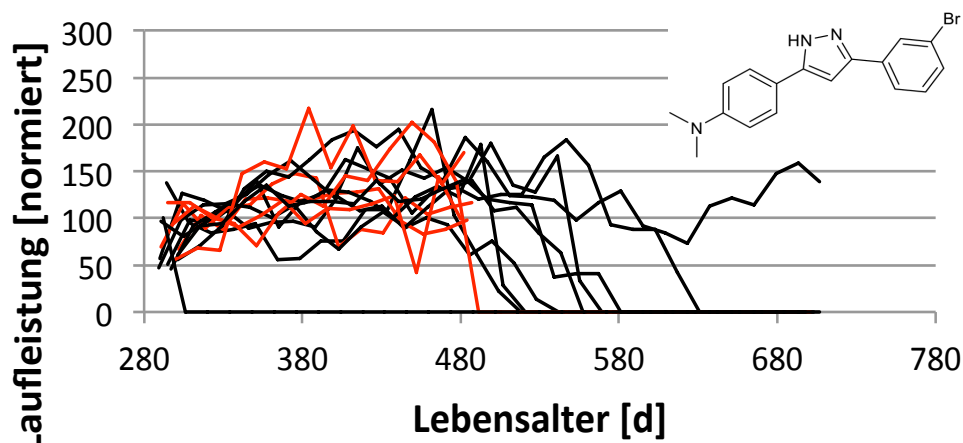
d) **sery335b ab Woche 30 normiert**e) **sery383 ab Woche 30 normiert**f) **anle253b ab Woche 30 normiert**

Abb. 10: Relative Laufleistung der Mäuse auf dem RotaRod pro Versuchsgruppe. Jede Linie stellt ein Tier dar. Sie zeigen den prozentualen Anteil der Zeit, den eine Maus pro Messtag auf dem RotaRod gelaufen ist in Relation zur errechneten Baseline, der mittleren Laufleistung für jedes Tier über die ersten fünf Messtage. Die Laufleistung ist gegen das Lebensalter der Mäuse am Messtag aufgetragen. Die schwarzen Linien stehen für die Tiere, die solange im Versuch erfasst wurden, bis sie ihrer Krankheit erlegen waren. Die roten Linien stehen für Tiere, die designiert nach 69 Wochen aus dem Experiment entnommen wurden. Abb. **a)** Placebokontrollgruppe **b)** anle138b mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche **c)** anle138b mit Fütterung ab der 50. Lebenswoche **d)** sery335b mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche **e)** sery383 mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche **f)** anle253b mit Fütterung ab der 30. Lebenswoche

Die normierten Diagramme unterscheiden sich von den Diagrammen mit absoluten Laufzeitwerten in zwei von drei der oben beschriebenen Parameter. Die Überlebensdauer ändert sich nicht durch die andere Form der Darstellung und bleibt dementsprechend bei der weiteren Betrachtung der Abb. 10 unberücksichtigt. Die Laufleistung in Prozentangaben und der Abfall der Kurven zur x-Achse zeigen andere Werte an, als bei den Diagrammen mit absoluten Werten.

Die relativen Laufleistungen schwankten bei der Placebogruppe zwischen 60 und 230%. Die Leistungen jeder einzelnen Maus fluktuieren in hohem Maße (siehe Abb. 10a). Es war nicht vorhersehbar, wie sich die Leistungen der Tiere im Krankheitsverlauf entwickelten. Die nicht konstanten Leistungen begannen mit dem Beginn der Messungen. Erst in den letzten Tagen vor dem Ableben bzw. der terminalen Entnahme zeigte sich der auch in den vorhergehend gezeigten Darstellungen erkennbare markante Leistungsabfall. Er stellte in der Geschwindigkeit der Krankheitsprogression keinen wesentlichen Unterschied zu dem Abfall in den Diagrammen mit den absoluten Werten dar.

Bei den beiden anle138b behandelten Gruppen waren im Vergleich zu den übrigen Substanzgruppen größere Fluktuationen in den Laufleistungen erkennbar. Im Unterschied zu der Placebogruppe begannen diese jedoch erst ab dem 380. Lebenstag und damit gut drei Monate nach der ersten Messung. In dem Zeitraum der ersten 100 Lebenstage lagen die Laufzeiten der Mäuse in einem Rahmen von 60 bis 150% bei der Gruppe mit Substanzgabe ab der 30. Lebenswoche (siehe Abb. 10b) und zwischen 45 und 165% bei der Gruppe mit Substanzgabe ab der 50. Lebenswoche (siehe Abb. 10c). Danach gab es in beiden Gruppen Ausreißer, die über 250% ihrer gemittelten Laufleistung erreichten. Während bei der anle138b Gruppe, die nach 30 Tagen mit der

Substanz angefüttert wurde, lediglich ein Tier erheblich vom Mittel abweichende Werte hatte, waren es bei der Gruppe mit Substanzgabe ab der 50. Woche deutlich mehr Tiere. Die mit sery335b behandelte Gruppe zeigte im Vergleich aller Gruppen die konstantesten Leistungen. Sie schwankten ab dem ersten Messtag zwischen 50 und 170%, die Fluktuationen wurden zu keiner Zeit des Experimentes größer (siehe Abb. 10d).

Bei der sery383 Gruppe lagen die relativen Laufleistungen in den ersten 100 Tagen nach der ersten Messung zwischen 60 und 150%. Erst danach gab es einzelne Tiere, die Leistungsspitzen von bis zu 230% ihrer Baseline erreichten (siehe Abb. 10e). Im Gruppenvergleich waren die Fluktuationen ähnlich anzusiedeln wie die der anle138b Gruppe mit Substanzgabe ab der 50. Lebenswoche.

Die mit anle253b behandelte Gruppe hatte, wie die anderen Substanzgruppen, zu Beginn der Therapie einen Zeitraum, in dem die Fluktuationen der Leistungen geringer waren als nach den ersten 100 Tagen nach Messbeginn. In diesem Zeitraum lagen die Schwankungen zwischen 55 und 160% der eigenen gemittelten Leistung der jeweiligen Maus. Ab dem 380. Lebenstag gab es einige Tiere, die Leistungen von gut 200% ihrer eigenen Baseline erreichten (siehe Abb. 10f).

Betrachtet man nun noch einmal den Abfall der Kurven zur x-Achse, sind bei allen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede zu den Kurven mit den absoluten Werten erkennbar. Auch hier bestätigte sich die Beobachtung, dass die Tiere in kürzester Zeit eine solch ausgeprägte klinische Symptomatik entwickelten, dass sie das Experiment verlassen mussten.

1.3 Laufleistungen im Gruppenvergleich

In folgendem Diagramm (siehe Abb. 11) ist ein Teil der beschriebenen Ergebnisse noch einmal graphisch zusammengefasst.

Auf der x-Achse sind die Lebenswochen aufgetragen, sie sind jeweils in dem zweiwöchigen Messrhythmus angegeben.

Auf der Y-Achse sind die jeweiligen Gruppen aufgelistet. Jede Gruppe ist einer Linie und einer geometrischen Figur zugeordnet.

Auf den ersten Blick erkennt man, dass es vier Gruppen gibt, in denen die Mäuse deutlich längere Überlebenszeiten haben als in den anderen. Es handelte sich um die mit anle138b behandelte Gruppe sowohl mit Anfütterung nach der 30. Lebenswoche, als

auch mit Anfütterung nach der 50. Lebenswoche, die sery335b Gruppe und die anle253b Gruppe. Die Tiere aus der mit Placebo behandelten Gruppe hatten mit Abstand die kürzesten Überlebenszeiten.

Die sery383 Gruppe hatte die kleinsten Fluktuationen, die Lebzeiten der Tiere waren am engsten beieinander.

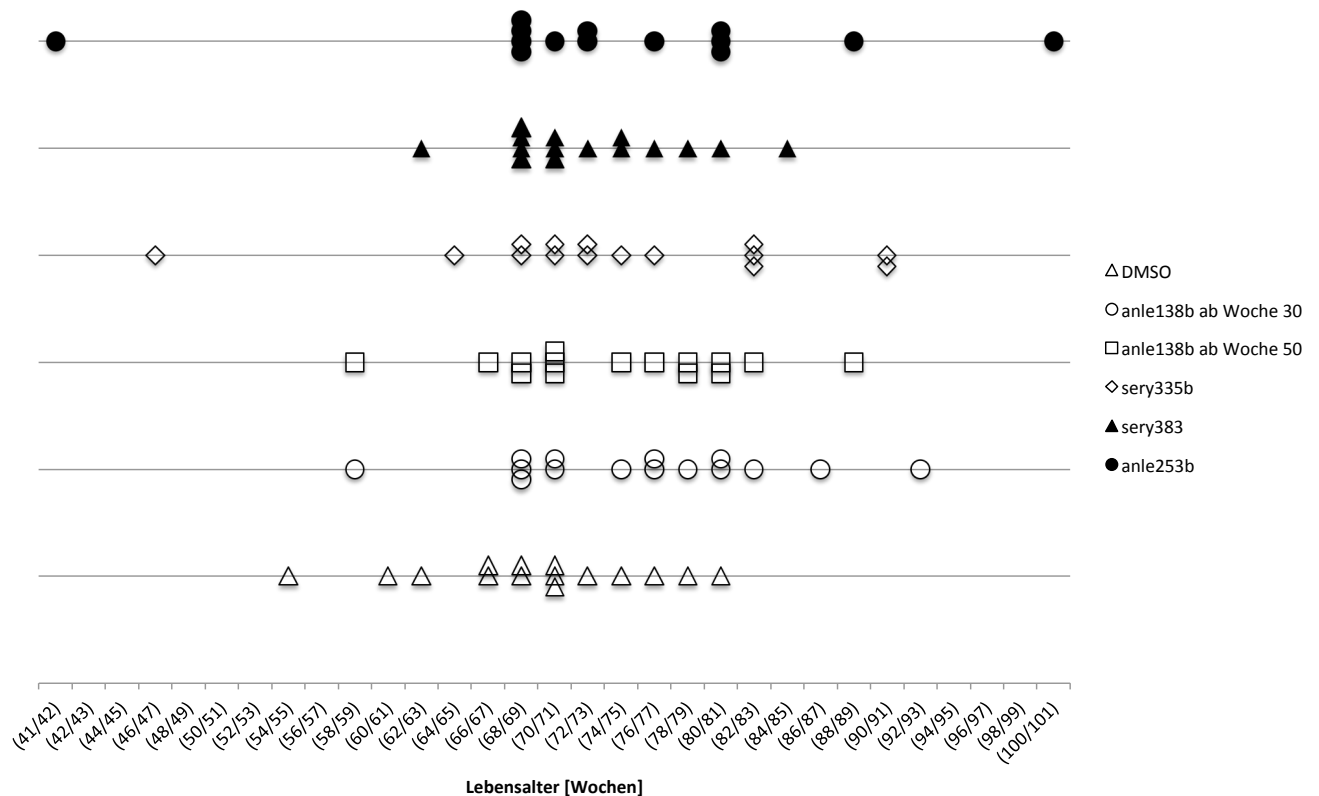


Abb. 11: Überlebenszeiten der Versuchstiere nach Versuchsgruppen. Die Placebogruppe hatte die kürzeste Überlebenszeit. Die Tiere der mit Substanzen behandelten Gruppen lebten im Durchschnitt alle länger. Die absolut längste Überlebenszeit erreichte ein Tier der anle253b Gruppe mit 100 Wochen.

2. Gewichtsentwicklung

Ein wichtiger klinischer Parameter zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs war das Körpergewicht der Mäuse. Es wurde wie die RotaRod Daten alle zwei Wochen erhoben, jeweils am mittleren der drei Messtage. Alle Gewichte der einzelnen Tiere wurden tabellarisch über ihren Lebenszeitraum gesammelt.

In den folgenden Diagrammen ist die Gewichtsentwicklung der Tiere über ihre Lebensdauer den jeweiligen Gruppen zugeordnet.

Auf der x-Achse ist das Alter der Mäuse in Tagen aufgetragen, auf der y-Achse das Gewicht in Relation zu ihrer Baseline. Diese ist der Mittelwert der Gewichte über die ersten fünf Messtage, äquivalent zu der Baseline der Laufleistungen.

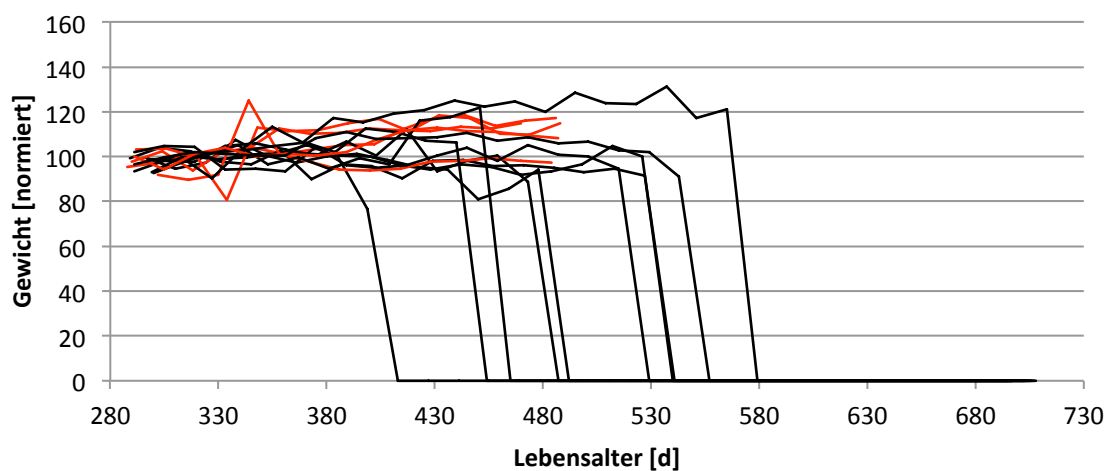
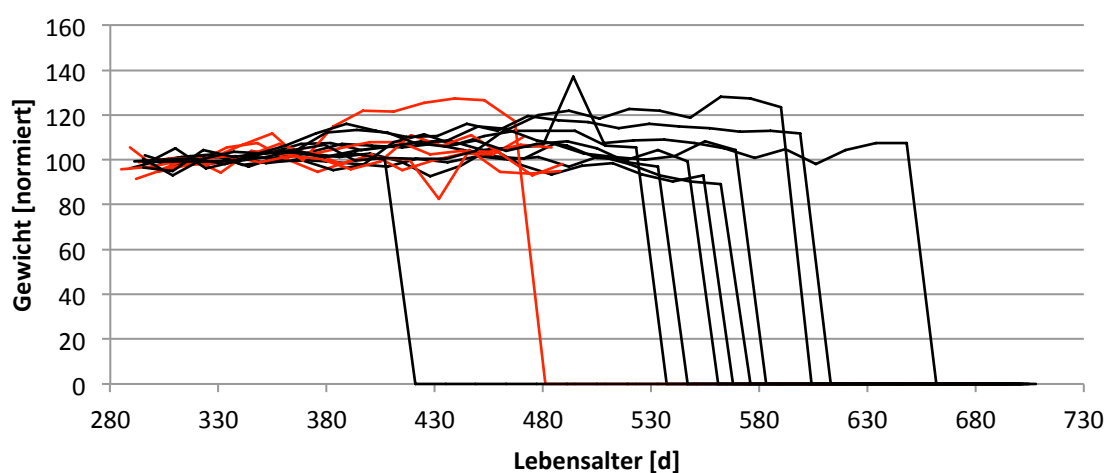
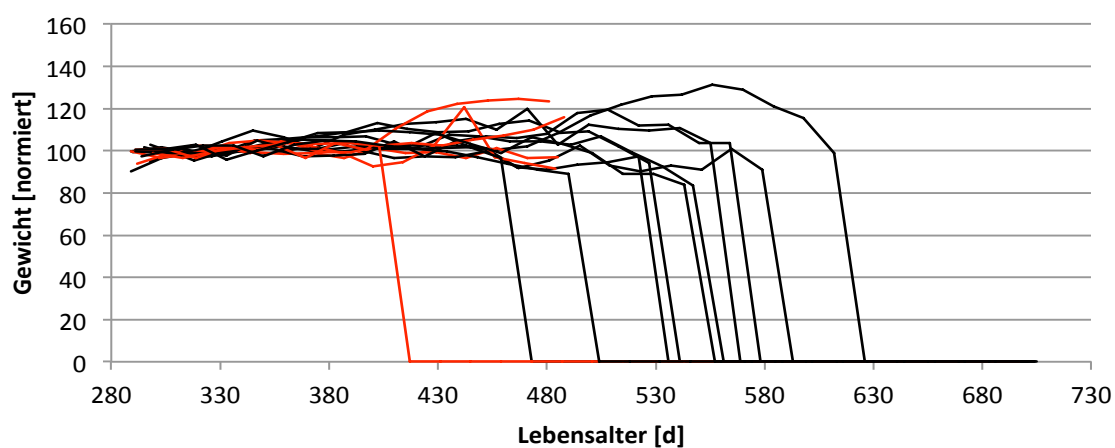
Jede Kurve gibt den Gewichtsverlauf einer Maus wieder.

Schwarze Linien symbolisieren alle Tiere, die regulär mit Phänotyp aus dem Experiment ausgeschieden sind. Sie berühren die x-Achse, da sie nach ihrem terminalen Ausscheiden mit 0s Laufleistung geführt werden (s. Diagramme über die RotaRod Performance). Die roten Linien gehören zu den Tieren, die designiert nach der 69. Lebenswoche aus dem Experiment entnommen wurden. In diesem Fall wurden die Daten nach dem Ausscheiden der Tiere nicht weiter geführt, womit die Kurven abrupt enden.

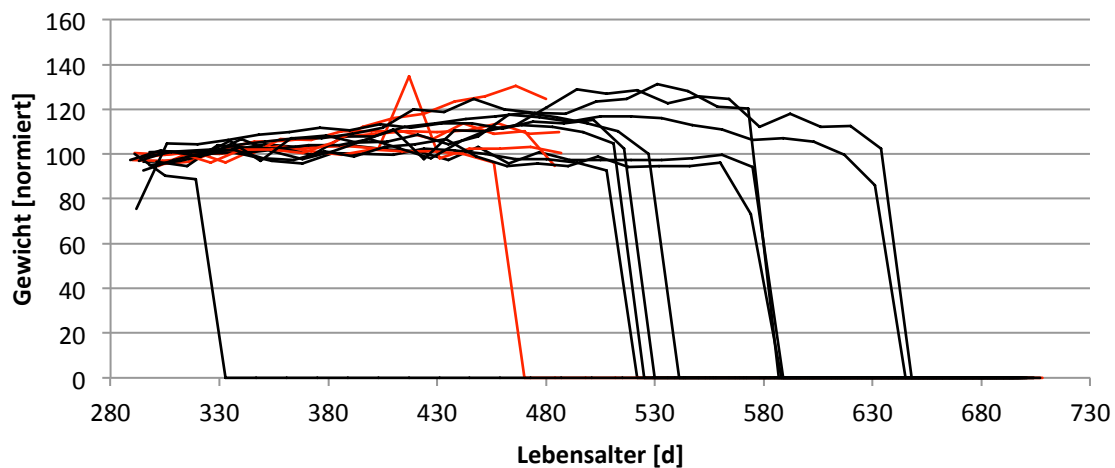
In der folgenden Diagrammbeschreibung wurde zur Vermeidung von Wiederholungen nur auf die Veränderungen und den Vergleich der Gewichte zwischen den einzelnen Gruppen eingegangen, nicht auf die Überlebenszeit (x-Achse). Ausführliche Darstellung derselben wurde im Abschnitt D 1. gegeben.

Das Gewicht der Tier war neben dem Zustand des Fells und dem gesamten Erscheinungsbild der Mäuse, nur ein Merkmal unter vielen für den Krankheitszustand. Daher wurde an dieser Stelle darauf verzichtet neben der relativen Gewichtsentwicklung auch die absoluten Gewichte der Tiere zu zeigen. Die relative Gewichtsentwicklung ist aussagekräftiger als die absoluten Zahlen (siehe C. 2.2 Auswahl der Messwerte).

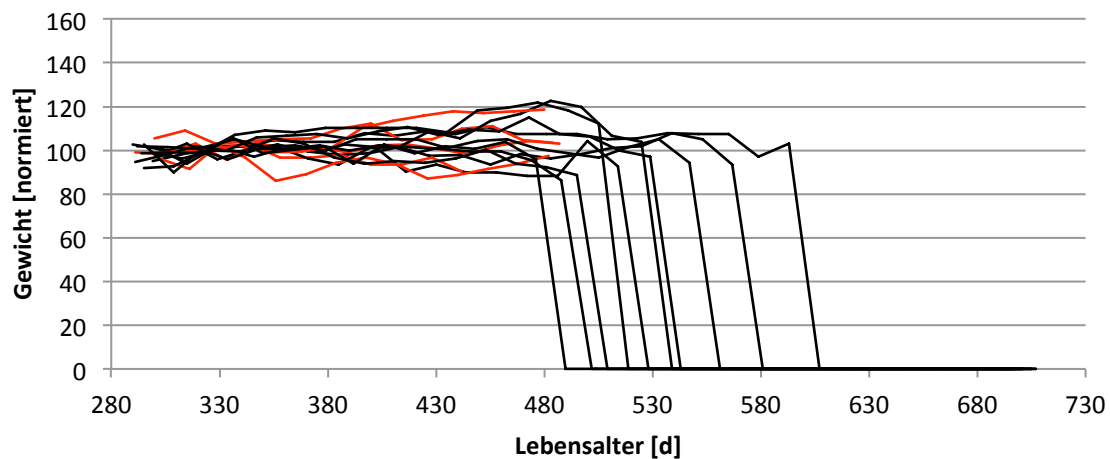
2.1 Relative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

a) **DMSO Gewicht normiert**b) **anle138b ab 30 Woche Gewicht normiert**c) **anle138b ab Woche 50 Gewicht normiert**

d)

sery335b Gewicht normiert

e)

sery383 Gewicht normiert

f)

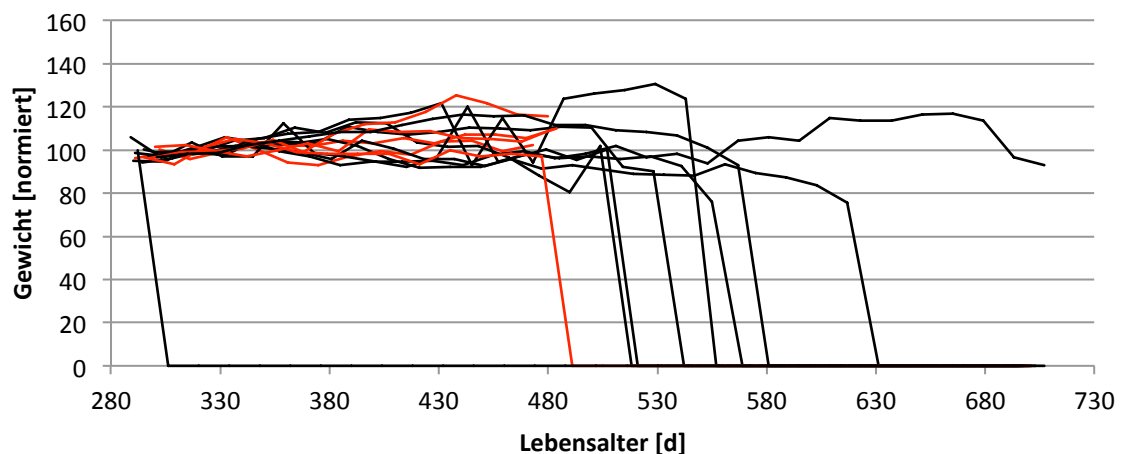
anle253b Gewicht normiert

Abb. 12: Relative Gewichtsentwicklung der Mäuse pro Versuchsgruppe. Jede Linie stellt ein Tier dar, rote Linien stehen für Tiere, die geplant nach 69 Lebenswochen aus dem Experiment entnommen wurden. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil des Gewichtes, den eine Maus pro Messtag gewogen hat in Relation zur errechneten Baseline, dem Mittelwert für jedes Tier über die ersten fünf Messtage. Das Gewicht ist

gegen das Lebensalter der Mäuse am Messtag aufgetragen.

Das Gewicht der mit Placebo behandelten Mäuse fluktuierte zwischen 80 und 130% von der jeweiligen Baseline. Die Fluktuationen begannen ab dem 335. Lebenstag und nahmen bis zum 580. Lebenstag leicht zu (siehe Abb. 12a). Insgesamt war das Intervall, in dem die Gewichte sich über die Lebenszeit veränderten, deutlich kleiner als das der Laufleistungen. Die Fluktuationen waren individuell unterschiedlich und es ließ sich keine Regelmäßigkeit feststellen. Die meisten Tiere verloren vier bis sechs Wochen, bevor sie aus dem Experiment ausgeschieden sind an Gewicht. Es gab jedoch auch Tiere, die in der Woche, in der sie ausgeschieden sind, im Vergleich zur Vorwoche noch an Gewicht zulegten. Auch hier waren keine Regelmäßigkeiten zu erkennen.

Das relative Gewicht der Mäuse, die geplant mit 69 Lebenswochen entnommen wurden, lag etwa in dem gleichen Intervall wie das der übrigen Tiere.

Im Vergleich zur anle138b behandelten Gruppe, deren Versuchstiere ab der 30. Woche mit der Substanz gefüttert wurden fiel auf, dass die Fluktuationen in höherem Alter begannen. Während bei der Placebogruppe die ersten größeren Abweichungen vom Durchschnittsgewicht mit 335 Lebenstagen begannen, starteten sie bei der anle138b behandelten Gruppe erst mit 400 Tagen (siehe Abb. 12b). In beiden Kurven war ähnlich, dass die Fluktuationen in den einzelnen Kurven nicht besonders ausgeprägt waren. In der anle138b behandelten Gruppe, die ab der 30. Lebenswoche die Substanz bekam, erkannte man den gleichen Trend, dass die Mäuse vor dem Ableben an Gewicht verloren. Der Gewichtsverlust trat im Durchschnitt jedoch ein wenig später auf als bei der Placebogruppe, nämlich 14 Tage vor ihrem Tod.

Die Graphen der mit 69 Lebenswochen entnommenen Mäuse zeigten einen ähnlichen Verlauf. Die Gewichte nahmen vor den Entnahme nicht ab, wie die derjenigen Mäuse, die terminal erkrankten.

Das Diagramm der anle138b behandelten Gruppe, die die Substanz erst im Alter von 50 Wochen bekam, war sehr regelmäßig ohne große Ausschläge nach oben oder nach unten.

Der Bereich, in dem das relative Gewicht dieser 50 Mäuse fluktuierte, war im Vergleich zu den beiden vorangegangenen Gruppen am niedrigsten. Die Gewichte schwankten größtenteils zwischen 90 und 120%. Lediglich ein Tier erreichte an einem Messtag ein Gewicht von 130% seiner Baseline (siehe Abb. 12c). Die geringen Abweichungen von

der Baseline begannen zudem erst in sehr hohem Alter im Vergleich mit den vorhergehenden Gruppen, erst mit 430 Tagen.

Ähnlich wie bei den anderen Gruppen war der Trend, dass das Gewicht der Tiere abnahm, bevor sie terminal das Experiment verließen. Meistens trat der Gewichtsverlust jedoch nicht früher als 2 Wochen vor dem Tag des Ausscheidens ein.

Auch in dieser Gruppe zeigten die Gewichte der vorherbestimmten Tiere, die zum Zeitpunkt von 69 Wochen entnommen wurden nicht den für die terminalen Tiere üblichen Gewichtsverlust vor der Entnahme.

Die Gewichte der mit sery335b behandelten Gruppe zeigten größere Unregelmäßigkeiten auf als die vorherigen Gruppen.

Die relativen Gewichte aller Tiere dieser Gruppe lagen zwischen 75 und 135%. Die Ausschläge begannen schon ab dem ersten Messtag, ab dem 330. Lebenstag bis zum 400. Lebenstag blieben die Gewichte in einem Intervall von 90 bis 110% konstant (siehe Abb. 12d).

Wie in den anderen Gruppen nahm das Gewicht mit zunehmender Erkrankung ab. Die Gewichtsabnahme beschränkte sich in dieser Gruppe auf die letzten zwei Messtage vor dem Tod. Damit lag das Zeitintervall der Gewichtsabnahme zwischen dem, der Placebogruppe und dem der anle138b behandelten Gruppe.

Die Gewichte der Mäuse, die mit 69 Lebenswochen aus dem Experiment gingen, verhielten sich wie in den anderen Gruppen ohne einen signifikanten Gewichtsverlust vor der Entnahme.

Die Gewichte der Mäuse der sery383 behandelten Gruppe fluktuierten zwischen 90 und 120% und wiesen damit geringere Abweichungen auf, als die Gewichte der sery335b behandelten Gruppe und die Gewichte der ab der 30. Lebenswoche behandelten anle138b Gruppe (siehe Abb. 12e). Die Abweichungen ähnelten denen, der ab der 50. Lebenswoche behandelten anle138b Gruppe. Im Vergleich zu letzterer begannen die Fluktuationen jedoch früher, schon ab dem 340. Lebenstag.

Ein Gewichtsabfall vor terminaler Entnahme war auch in dieser Gruppe größtenteils zu beobachten. Er trat wie in den anle138b Gruppen im Durchschnitt zwei Wochen vor dem Ableben der Tiere auf.

Die 69 Wochen alten Mäuse, die gezielt entnommen wurden, nahmen zu ihrem Entnahmezeitpunkt in den meisten Fällen noch an Gewicht zu.

Die Graphen der anle253b Gruppe waren in der Lebenszeit der Mäuse bis zum 480 Tag recht einheitlich. Das relative Gewicht schwankte zwischen 90 und 125% (siehe Abb. 12f). Damit waren die Abweichungen bis zu dem genannten Zeitpunkt ähnlich gering wie in der sery383 behandelten Gruppe und der ab der 50. Lebenswoche behandelten anle138b Gruppe. Ab dem 480. Lebenstag lag die Spanne des relativen Gewichtes allerdings zwischen 80 und 135%, was der Größe der Spanne der Placebogruppe und der sery335b behandelten Gruppe entsprach. Bis die Fluktuationen begannen, waren die Tiere, die mit anle253b behandelt wurden, im Gruppenvergleich am ältesten.

Die Gewichtsabnahmen vor dem Tod der Mäuse begannen zwei bis sechs Wochen vor der terminalen Entnahme. Die Mäuse zeigten schon etwas früher klinische Symptome ihrer Krankheit als die übrigen Substanzgruppen.

Die Mäuse, die in der 69. Lebenswoche aus dem Experiment genommen wurden, hatten zu ihrem Entnahmezeitpunkt immer noch ein gleichbleibendes oder sogar leicht zunehmendes Gewicht.

3. Kaplan-Meier-Kurven

Zur statistischen Auswertung der Überlebenszeiten der Versuchstiere wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Dies ist eine gängige Methode bei klinischen Studien, um die Wahrscheinlichkeiten abzuschätzen, dass bei dem Versuchsteilnehmer ein bestimmtes Ereignis eintritt. Grundlage der Kaplan-Meier-Kurven waren die Überlebensdaten (Survival-Daten).

Bei den Kaplan-Meier-Kurven sind auf der x-Achse das Lebensalter in Tagen aufgetragen, auf der y-Achse die Prozentzahlen der zu diesem Zeitpunkt überlebenden Mäuse. Für die jeweiligen Gruppen wurden verschiedene Farben und Formen gewählt, dessen Zuordnung man der Legende entnimmt.

Für die Berechnungen der statistischen Tests wurden die Leistungen aller Mäuse gewertet. Dafür wurden sie danach eingeteilt, ob sie das Kriterium erreicht hatten oder nicht. Das Kriterium erreichten alle Tiere, mit der für PD typische Pathologie, die tot im Käfig aufgefunden wurden und alle diejenigen Tiere, die mit Phänotyp aus dem Experiment entnommen wurden. Tiere die keines der beiden oben genannten Kriterien erreichten, waren zum Beispiel Mäuse, die zwar tot im Käfig aufgefunden wurden, aber keine Pathologie aufwiesen, Tiere mit Hautläsionen, Tumoren oder Missbildungen, die keine klinischen Symptome zeigten, unabhängig von der Neuropathologie. Einzig die mit

69 Wochen entnommenen Mäuse ohne Krankheitszeichen wurden zensiert und aus den Berechnungen herausgehalten, da ihr Entnahmezeitpunkt schon vor Beginn des Experimentes feststand.

Zum Vergleich der Überlebenskurven und zur Validierung der Ergebnisse wurden zwei verschiedene statistische Tests verwendet.

Zum einen wurde der Log-rank (Mantel-Cox) Test durchgeführt, zum anderen der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test.

Ersterer ist ein nicht parametrischer Signifikanztest, der zwei unabhängige Kaplan-Meier-Kurven auf Gleichheit überprüft (50). Er ist aussagekräftiger, wenn die Hazard Funktion proportional ist. Dies bedeutet, dass das Verhältnis der Hazard Funktion (Tod/Zeit) zu allen Zeiten gleich ist. Es wird außerdem angenommen, dass das Verhältnis über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant bleibt.

Auch der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test vergleicht zwei Überlebenskurven. Er wertet allerdings das Eintreffen des Ereignisses (Tod) zu frühen Zeitpunkten deutlich mehr als der Log-rank Test, der alle Todeszeitpunkte gleich gewichtet (51).

Mithilfe dieser beiden statistischen Tests wurden wiederum zwei verschiedene, klinische relevante Parameter untersucht.

Erstens wurde das verlängerte Überleben ohne Krankheitssymptome angeschaut (disease-free survival). Als Referenz für ein verlängertes Überleben ohne Krankheitssymptome für die behandelten transgenen Mäuse, dienten Wildtypmäuse. Die Wildtypmäuse wurden in den Versuchen von der medizinischen Doktorandin Frau Catharina Prix untersucht. Der Grenzwert für das disease-free survival wurde definiert, als der Mittelwert der Laufleistungen der nicht transgenen Wildtypmäuse minus drei Standardabweichungen (87). Dieser Mittelwert betrug 55,28 Sekunden. Bei einem Abfall der motorischen Leistungsfähigkeit der Mäuse in meinem Experiment unter diesen Wert, wurden die Tiere als krank gewertet. Die Kaplan-Meier-Kurven zum disease-free survival beziehen sich alle auf diesen genannten Wert.

Zweitens wurde mittels der Kaplan-Meier-Statistik die absolut verlängerte Überlebenszeit der Mäuse mit Fütterung von therapeutischen Substanzen mit den Mäusen verglichen, die mit Placebo behandelt wurden. Für die Placebogruppe wurden, neben meinen mit Placebo behandelten Versuchstieren, zusätzlich die weiblichen mit Placebo behandelten Tiere aus dem Experiment von Frau Catharina Prix verwendet. Bevor die Gruppen für die statistische Auswertung zusammen genommen wurden, wurde geprüft, ob die Krankheitsprogression in beiden Experimenten ähnlich war. Zu

dieser Analyse wurden die Mittelwerte des Log-rank Tests und die Mittelwerte der Überlebensdaten jeweils von der Placebogruppe verglichen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,49$) (104).

3.1 Verlängerte Überlebenszeit ohne Krankheitssymptome

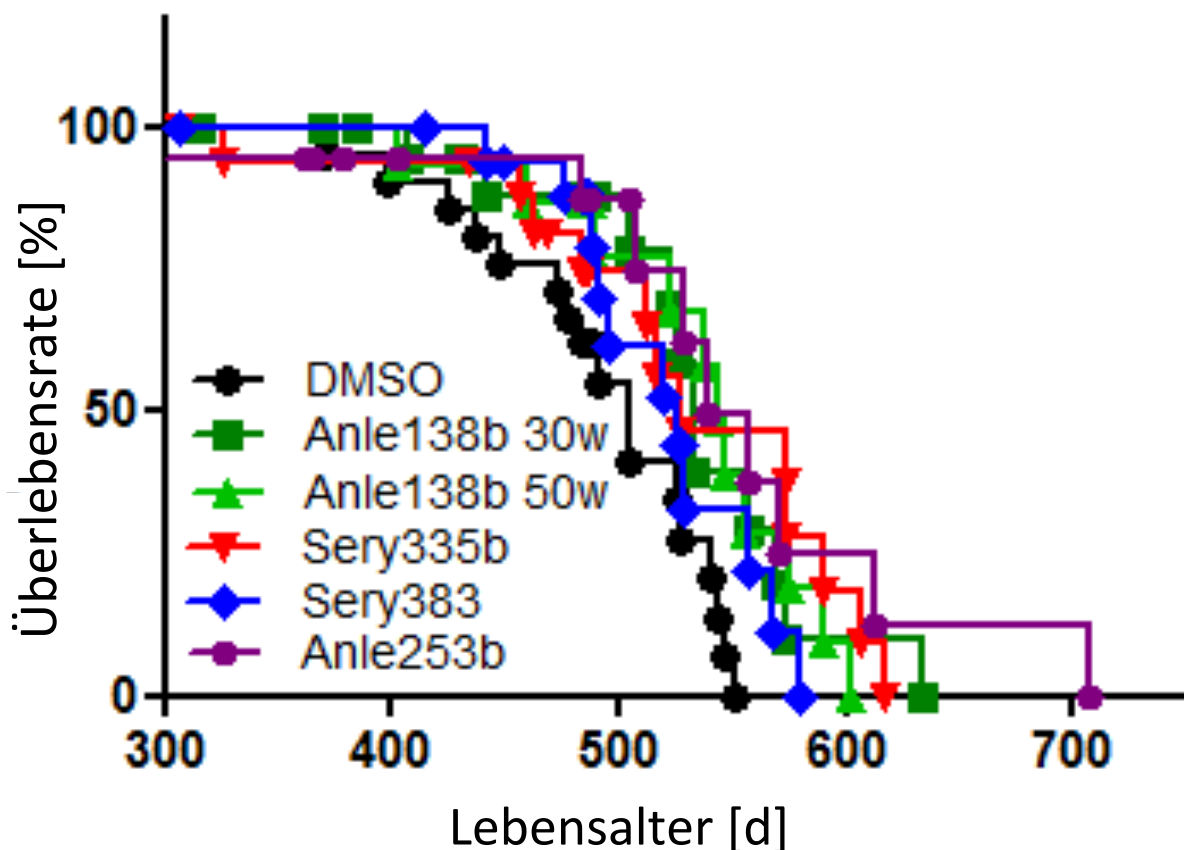


Abb. 13 Kaplan-Meier-Vergleich zum krankheitsfreien Überleben zwischen der Placebogruppe und allen Behandlungsgruppen. Die Placebo behandelten Mäuse hatten im Vergleich zu den Behandlungsgruppen in jedem Lebensalter den geringsten Prozentsatz an Tieren, die ohne Symptome lebten.

Das Diagramm gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analyse zum krankheitsfreien Überleben im Gruppenvergleich. Deutlich ist erkennbar, dass die mit Placebo behandelten Wildtypmäuse in jedem Lebensalter einen geringeren Prozentsatz an Tieren hatten, die ohne Symptome lebten, als die Substanzgruppen. Alle anderen Tiergruppen entwickelten die motorischen Symptome zu späteren Zeitpunkten.

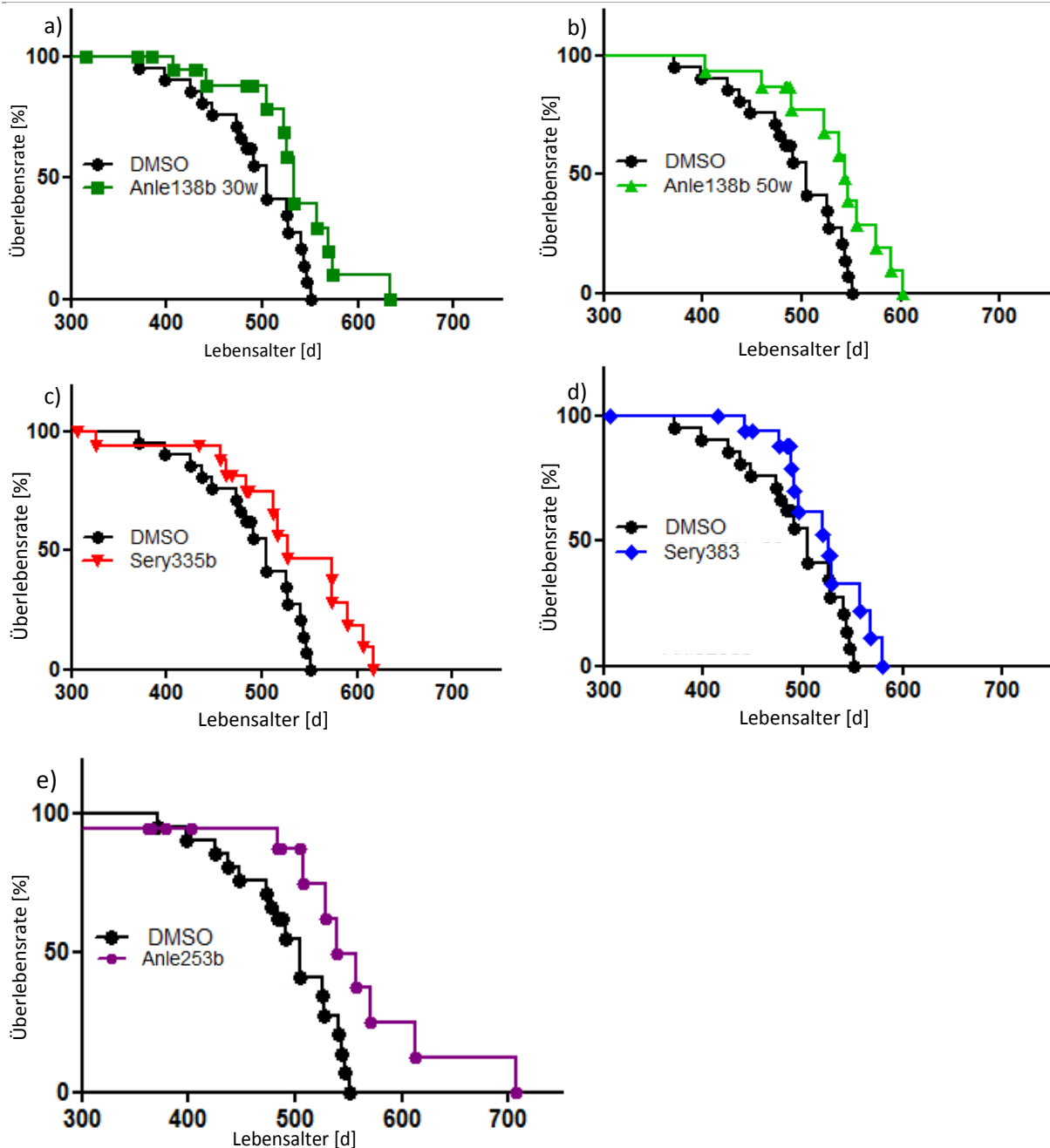


Abb. 14 Kaplan-Meier-Vergleich zum krankheitsfreien Überleben zwischen der Placebogruppe und den einzelnen Behandlungsgruppen. Die Graphen der beiden anle138b Gruppen verliefen sehr ähnlich. Die Graphen der Sery335b behandelten Gruppe und vor allem der, der Sery383 behandelten Gruppe hatten im Gruppenvergleich den ähnlichsten Verlauf mit der Placebogruppe. In der mit anle253b behandelten Gruppe war das Leben ohne Symptome am längsten möglich.

Der Graph der anle138b Gruppe, die ab der 30. Woche mit der Substanz behandelt wurde und der Graph der Placebogruppe verliefen bis zum 380. Tag parallel. Zu diesem Zeitpunkt verließ die erste Placebo behandelte Maus das Experiment und der Prozentsatz der Tiere, die in der Placebogruppe symptomfrei überlebten, sank auf 90%. In der zweiten anle138b Gruppe geschah der erste Abfall der Kurve erst am 405. Lebenstag. Bis zum 500. Lebenstag blieb der Prozentsatz der anle138b gefütterten

Mäuse, die keine Symptome zeigen, bei 80%, während der Prozentsatz der Placebo behandelten Mäuse zum gleichen Zeitpunkt nur noch 40% betrug. Die anle138b Gruppe hatte den ersten größeren Einschnitt im symptomfreien Überleben zwischen dem 500. und dem 540. Tag. Die Rate der symptomfrei überlebenden Mäuse sank auf 40%. Während alle mit Placebo gefütterten Mäuse bis zum 550. Tag Symptome entwickelten, blieb ein Teil der mit anle138b gefütterten Mäuse bis zum 620. Tag ohne Krankheitszeichen.

Sowohl der Log-rank Test als auch der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test waren für die Tiere der anle138b Gruppe, die ab der 30. Woche mit der Substanz gefüttert wurden, gegenüber der Placebogruppe signifikant. Die durchschnittliche symptomfreie Überlebenszeit der anle138b Gruppe betrug 533 Tage, die der Placebogruppe 504 Tage. Die Hazardrate betrug 2,7.

Vergleicht man die Placebogruppe mit der in der 50. Woche angefügterten anle138b Gruppe, so erkennt man, dass die Graphen, wie bei der früher gefütterten anle138b Gruppe bis zum 380 Tag parallel verliefen. Ab dem 380 Tag machte die Placebogruppe einen Knick um 5% nach unten, gefolgt vom Graphen der anle138b Gruppe, der nach 400 Tagen um 5% einknickte. Nun änderte sich der Verlauf der Graphen. Der Graph, der später mit der Substanz gefütterten anle138b Gruppe, blieb bis zum 460. Tag konstant auf 90% ohne Symptome überlebenden Tieren. Bei den Mäusen der Placebogruppe bekamen nach dem ersten Einbruch immer mehr Tiere Symptome. Nach 490 Tagen lebten lediglich noch 60% der Tiere ohne Symptome. In der anle138b Gruppe waren zum selben Zeitpunkt noch 80% der Tiere ohne Symptome.

Zwischen dem 490. und dem 550. Tag entwickelten allerdings auch viele Tiere der spät angefügterten anle138b Gruppe Symptome, sodass zu diesem Zeitpunkt nur noch 60% Tiere symptomlos waren. Die Tiere der Placebogruppe entwickelten alle zwischen dem 500. und dem 550. Lebenstag Symptome, die der spät angefügterten anle138b Gruppe leben noch bis zur 600. Tag symptomfrei (siehe Abb. 14b).

Die Ergebnisse der statistischen Tests ergaben für den Log-rank Test und den Gehan-Breslow-Wilcoxon Test eine Signifikanz. Die Hazardrate betrug 2,9, damit war die Entwicklung von Symptomen in der Placebogruppe 2,9 mal so wahrscheinlich wie in der anle138b Gruppe, die nach der 50. Woche die Substanz bekommen hat.

Die mittlere Überlebenszeit ohne Symptome in der später angefügterten anle138b Gruppe betrug 543 Tage, die in der Placebogruppe betrug 504 Tage (siehe Tab. 3).

Der Graph der sery335b Gruppe verläuft im Verhältnis zur Placebogruppe ähnlich dem der spät behandelten anle138b Gruppe. Eine Maus der sery335b Gruppe entwickelte zwar schon sehr früh nach 320 Tagen Krankheitssymptome, sodass ab diesem Zeitpunkt nur noch 90% der Mäuse symptomfrei überlebten. Der nächste Abfall des Graphen erfolgte allerdings erst am 480. Lebenstag. Wie in der anle138b Gruppe, die ab der 50. Woche mit Substanz gefüttert wurde, lebten im Alter von 550 Tagen noch ca. 60% der Mäuse symptomfrei. Bis zum 610. Lebenstag entwickelten auch alle Tiere dieser Gruppe Krankheitszeichen (siehe Abb. 14c).

Die Testergebnisse zeigten beim Log-rank Test einen signifikanten Unterschied der Kurven, beim Gehan-Breslow-Wilcoxon Test nicht. Die Hazardrate betrug 2,5 und war damit ein wenig kleiner, als in der späten anle138b Gruppe. Die mittlere Überlebenszeit ohne Symptome betrug 527 Tage. Damit lebten die Tiere der sery335b Gruppe 20 Tage kürzer ohne Symptome, als die Tiere der spät angefügten anle138b Gruppe (siehe Tab. 3).

Die Kurven von den mit Placebo und den mit sery383 behandelten Tieren liegen enger beieinander als die Graphen der anderen Substanzgruppen. Am 540. Lebenstag berühren sich die beiden Kurven sogar. In diesem Fall hat die Hazardrate keine Aussagekraft.

Die Kurven liefen bis zum 380. Tag parallel. Während in der Placebogruppe dann einige Tiere krank wurden, lebten die Tiere der sery 383 Gruppe bis zum 440. Lebenstag ohne neuerkrankte Mäuse weiter. Vom 500. bis zum 520. Tag nahm das symptomfreie Überleben in einem geringen Zeitraum von 100 auf 40 % ab und lag damit zu diesem Zeitpunkt auf dem gleichen Niveau wie bei der Placebogruppe. Diese hatte am 520. Tag ebenfalls eine symptomfreie Überlebensrate von 45%. Bis zum 590. Lebenstag hatten alle Tiere der sery383 Gruppe die krankheitstypischen Symptome entwickelt (siehe Abb. 14d).

Weder der Log-Rank Test noch der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test zeigten einen signifikanten Unterschied zur Placebogruppe.

Die mittlere symptomfreie Überlebenszeit war mit 525 Tagen zwar höher als die der Placebogruppe mit 504 Tagen, jedoch von allen Substanzgruppen am kürzesten (siehe Tab. 3).

Die Kaplan Meier Kurve zum disease-free survival der anle253b Gruppe begann im Gegensatz zu allen anderen Gruppen mit 90% der Tiere die symptomfrei überlebten, da gleich am ersten Tag der Messung eine Maus Symptome entwickelte. Dafür blieb der Graph bis zum 500. Tag auf der 90% Linie. So lang lebten in keiner anderen Gruppe so viele Mäuse symptomfrei. Zu diesem Zeitpunkt lebten in der Placebogruppe nur noch 60% der Tiere symptomfrei, in der späten anle138b und in der sery335b Gruppe circa 75% der Tier und in der sery383 Gruppe ebenfalls nur 60%. Die Wahrscheinlichkeit symptomfrei zu überleben sank bei der anle253b Gruppe vom 500. bis zum 600. Lebenstag auf 20%. Bis zum 705. Lebenstag blieb die symptomfreie Überlebensrate bei 20%. Dies ist mit Abstand die längste Zeit im Gruppenvergleich, die Mäuse symptomfrei überlebten (siehe Abb. 14e).

Die Hazardrate ist mit 3,2 die höchste unter den Substanzgruppen.

Sowohl der Log-rank Test mit einem p-Wert von 0,007 als auch der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test waren signifikant.

Die mittlere symptomfreie Überlebenszeit war mit 539 Tagen 35 Tage länger als die, der Placebogruppe und nach den anle138b Gruppen die längste im Gruppenvergleich (siehe Tab. 3).

Tab. 3 Statistische Daten zum krankheitsfreien Überleben der Behandlungsgruppen jeweils im Vergleich zu der Placebogruppe

Substanz	p-Wert (Log-rank Test) p-Level: 0,05	Signifikanz (Gehan-Breslow-Wilcoxon Test) p-Level: 0,05	medianes symptomfreies Überleben Δ =Behandlungs-/ Substanzgruppe [d]	Hazardrate
Anle138b ab Woche 30	0,017	0,044	29	2,7
anle138b ab Woche 50	0,012	0,012	39	2,9
sery335b	0,026	0,146	23	2,5
sery383	0,065	0,090	21	2,1
anle253b	0,007	0,038	35	3,2

3.2 Absolute Überlebenszeit

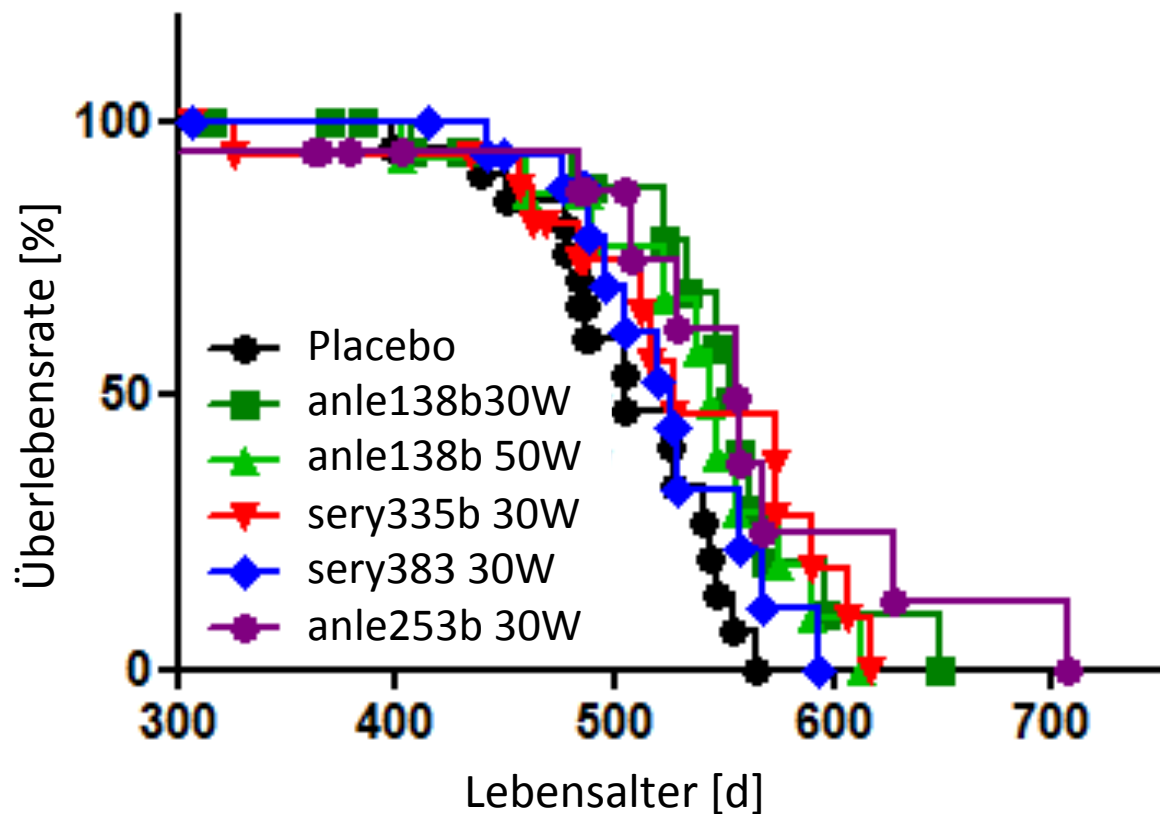


Abb. 15 Kaplan-Meier Vergleich zum absoluten Überleben zwischen der Placebogruppe und allen Behandlungsgruppen. Die mit Placebo behandelten Tiere hatten im Vergleich zu den Behandlungsgruppen in jedem Lebensalter die geringste Überlebensrate.

Das Diagramm zeigt einen unterschiedlichen Verlauf der Graphen für die verschiedenen Substanzgruppen. In diesem Überblick zeigte sich erneut, dass die Mäuse der Placebogruppe, die kürzeste Überlebenszeit hatten. Sie lebten durchschnittlich 21 Tage kürzer als die sery383 Gruppe, die von den Behandlungsgruppen die kürzeste Überlebenszeit hatte.

Der Verlauf der Kurven zeigt, dass von den Placebo-behandelten Tieren zu jedem Lebenszeitpunkt weniger Mäuse lebten als von den Tieren den Behandlungsgruppen.

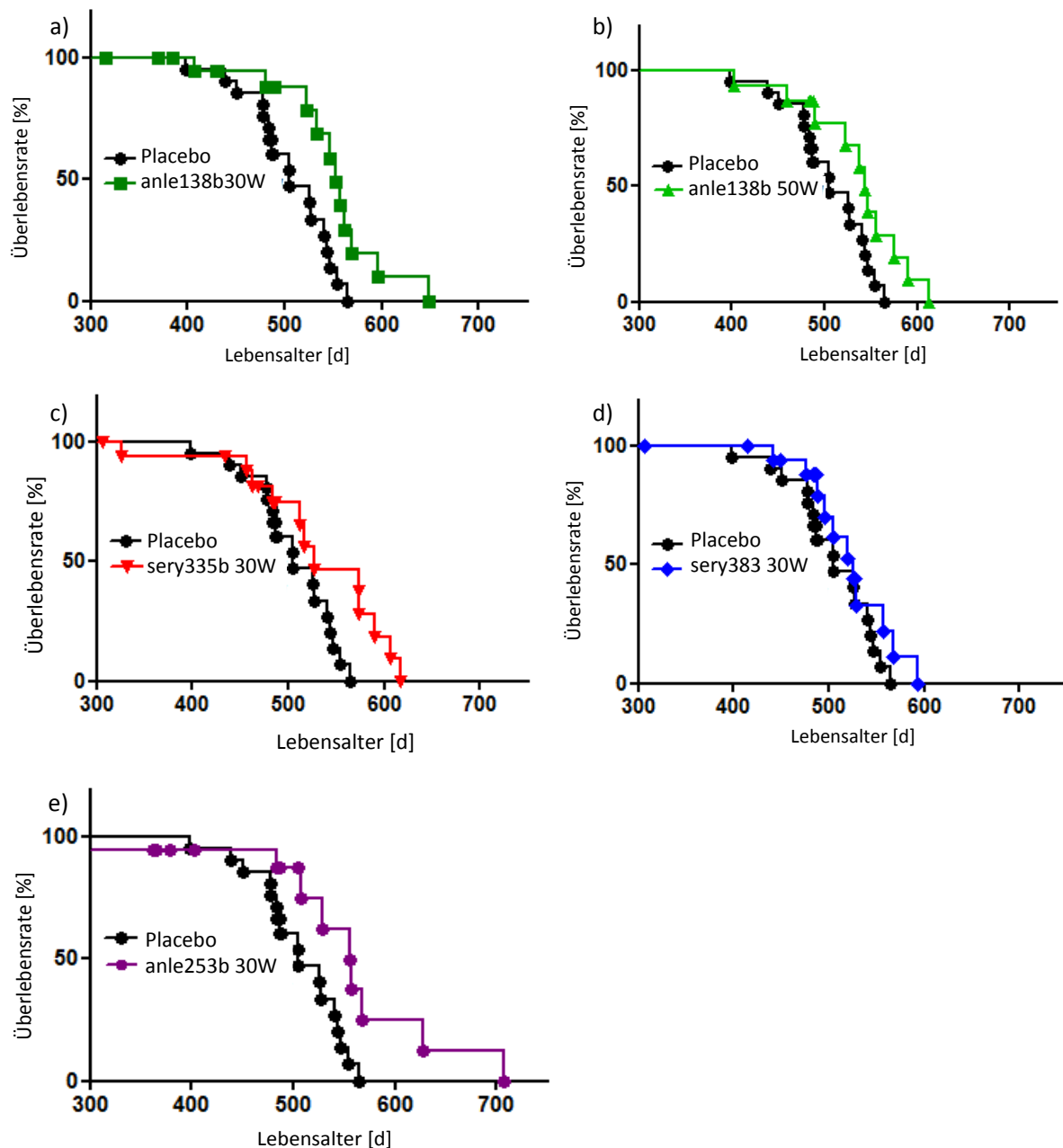


Abb. 16 Kaplan-Meier Vergleich zum absoluten Überleben zwischen der Placebogruppe und den einzelnen Behandlungsgruppen. Der Graph der *anle138b* Gruppe, die ab der 30. Woche behandelt wurde und der Graph der *anle253b* Gruppe haben den größten Abstand zu dem Graphen der Placebogruppe. Der Graph der *sery383* Gruppe verläuft sehr ähnlich dem der Placebogruppe.

Der Graph der *anle138b* Gruppe, die ab der 30. Woche mit der Substanz gefüttert wurde verläuft bis zum 400. Lebenstag parallel zu dem Graphen der Placebogruppe. Bis zu diesem Zeitpunkt ist in beiden Gruppen noch keine Maus aus dem Experiment entnommen worden. Am 400. Lebenstag ist die erste Maus der Behandlungsgruppe terminal entnommen worden, kurz darauf die erste Maus der *anle138b* Gruppe. Während in der *anle138b* Gruppe zum Zeitpunkt des 520. Lebenstages noch 80% der

Tiere lebten waren es in der Placebogruppe nur noch knapp 50%. Der Abfall der Kurve in der Placebogruppe begann also deutlich früher. Ab dem 520. Lebenstag mussten auch viele Tiere der Substanzgruppe das Experiment terminal verlassen. Am 580. Lebenstag lebten nur noch 20% der Tiere der Substanzgruppe. Aus der Placebogruppe schied zu diesem Zeitpunkt das letzte Tier terminal aus. Das letzte Tier der anle138b Gruppe starb nach circa 630 Tagen (siehe Abb. 16a).

Zusammengefasst war das Überleben der Tiere in der anle138b Gruppe signifikant verlängert gegenüber dem Überleben der Tiere in der Placebogruppe. Dies wurde auch in beiden statistischen Tests bestätigt. Die mittlere Überlebenszeit der ab der 30. Woche mit Substanz gefütterten anle138b Gruppe betrug 553 Tage. Die Tiere der Placebogruppe überlebten im Mittel nur 505 Tage. Die Hazardrate betrug 3,1 (siehe Tab. 4).

Der Verlauf der Graphen, der in der 50. Woche angeführten anle138b Gruppe und der Placebogruppe war bis zum 400. Lebenstag identisch. Wie in der früher behandelten anle138b Gruppe war bis zu diesem Zeitpunkt kein Tier erkrankt. Um den 400. Tag starben allerdings in beiden Gruppen Tiere, sodass zu diesem Zeitpunkt nur noch 90% der Tiere überlebten. Auch im weiteren Voranschreiten des Experimentes war der Kurvenverlauf der beiden Gruppen ähnlich. Bis zum 480. Lebenstag erkrankten in beiden Gruppen weitere Mäuse und hatten zu dem Zeitpunkt noch 80% überlebende Tiere. 80% der Tiere lebten in der früher angeführten anle138b Gruppe am 520. Tag.

Ab dem 480. Tag unterschieden sich die Graphen der späten anle138b Gruppe und der Placebogruppe. Am 520. Lebenstag lebten in der Placebogruppe noch 50% der Tiere, während es in der späten anle138b Gruppe noch 70% waren. Bis zum 610. Lebenstag überlebten Mäuse der anle138b Gruppe. Betrachte man diese Daten im Vergleich mit der anle138b Gruppe, die schon nach 30 Wochen behandelt wurde, war die Krankheitsprogression unwesentlich schneller (siehe Abb. 16b).

Auch im Vergleich der Placebogruppe mit der später behandelten anle138b Gruppe ist der Log-rank Test signifikant, der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test nicht. Das mittlere Überlebensalter betrug 543 Tage und unterschied sich damit nicht vom Alter des krankheitsfreien Überlebens in dieser Gruppe. Die Hazardrate war mit 2,4 deutlich kleiner als in der frühen anle138b Gruppe (siehe Tab. 4).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere der sery335b Gruppe war ähnlich der, der später angefügten anle138b Gruppe. Im Unterschied zu letztere verlor die sery335b Gruppe gleich zu Beginn der Messperiode ein Tier, womit die Überlebensrate am 320. Tag nur 90% betrug. Damit lag sie unter der Überlebensrate der Placebogruppe zu diesem Zeitpunkt. Die Überlebensrate der Placebogruppe fiel am 400. Lebenstag auf 90% ab. Wie bei der anle138b Gruppe, mit Behandlungsbeginn in der 50. Woche, war die Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum 480. Lebenstag ähnlich. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch 80% der sery335b Gruppe und der Placebogruppe. Ab dem 480. Lebenstag war die Überlebenswahrscheinlichkeit in der Substanzgruppe größer als in der Placebogruppe. Die Placebogruppe hatte am 500. Lebenstag noch 50 % überlebende Tiere, die sery335b Gruppe 70%. Während in der Placebogruppe das maximale Überleben bis zum 580. Lebenstag ging, lebten einige Tiere der sery335b Gruppe bis zum 610. Lebenstag (siehe Abb. 16c). Wie die anle138b Gruppe, die ab der 50. Woche behandelt wurde, hat auch die sery335b Gruppe nur unwesentlich schlechtere Überlebensraten als die anle138b Gruppe, die nach der 30. Woche behandelt wurde.

Der Log-rank Test zeigte eine signifikante Wirkung gegenüber der Placebogruppe, der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test nicht. Die Hazardrate mit 2,4 war (siehe Tab. 4).

Das mittlere Überlebensalter der Mäuse war in der sery335b Gruppe mit 527 Tagen deutlich kürzer als das der anle138b Gruppe, selbst mit Behandlungsbeginn nach der 50. Woche.

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten in der sery383 Gruppe und der Placebogruppe waren sehr ähnlich. Wie in den beiden anle138b Gruppen war die Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum 400. Lebenstag bei 100%. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der sery383 Gruppe war circa bis zum 450. Tag weiter bei 100%. Am 480. Tag hatten, wie in allen anderen Vergleichen der Placebogruppe und der Behandlungsgruppen, beide eine Überlebensrate von 80%. Ab diesem Zeitpunkt war die Überlebenswahrscheinlichkeit der sery383 Gruppe und der Placebogruppe gleich. Die Placebogruppe hatte nach 580 Tagen keine überlebenden Mäuse mehr, die sery383 Gruppe nach 595 Tagen (siehe Abb. 16d).

Weder der Log-rank Test, noch der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test zeigten signifikante Unterschiede. Die mittlere Überlebenszeit in der Gruppe betrug 525 Tage. Das war die kürzeste mittlere Überlebenszeit der mit Medikamentenkandidaten behandelten Gruppen.

Auch die Hazardrate war mit einem Wert von 1,8 von allen Behandlungsgruppen am kleinsten (siehe Tab. 4).

Bei dem Vergleich der Placebogruppe mit der anle253b Gruppe mithilfe der Kaplan-Meier-Analyse, zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Überlebenswahrscheinlichkeiten. Zwar begann der Graph der anle253b Gruppe nur bei 90% Überlebensrate, da ein Tier gleich zu Beginn der Messungen das Experiment terminal verließ, im weiteren Verlauf waren die Überlebenswahrscheinlichkeiten der anle253b Gruppe jedoch immer über denen der Placebogruppe. Bis zum 500. Lebenstag hatten die Tiere der anle253b Gruppe eine Überlebensrate von 90%. Ein so starker Substanzeffekt war sonst nur bei der anle138b Gruppe zu finden, die ab der 30. Wochen mit Substanz behandelt wurde. Bis zum 580. Lebenstag, an dem alle Placebo-behandelten Tiere gestorben sind, war die Überlebenswahrscheinlichkeit der anle253b Gruppe immer noch bei 60%. Auch bei diesem Wert konnte nur die frühe anle138b Gruppe mithalten. In dem Zeitraum um den 580 Lebenstag starben drei Tiere der anle253b Gruppe, sodass am 590. Tag nur noch eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 20% bestand. Am 705. Lebenstag wurde das letzte Tier der anle253b Gruppe aus dem Experiment genommen. Damit war der überlebensverlängernde Effekt in dieser Behandlungsgruppen am größten (siehe Abb. 16e).

Der Log-rank Test zeigte gegenüber der Placebogruppe einen signifikanten Effekt, der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test nicht. Die mittlere Überlebenszeit betrug 555 Tage und war damit noch einmal zwei Tage länger, als der Mittelwert der früh behandelten anle138b Gruppe.

Die Hazardrate betrug 3,1 und ist damit in der gleichen Größenordnung wie die, der frühen anle138b Gruppe (siehe Tab. 4).

Tab. 4 Statistische Daten zur absoluten Überlebenszeit der Behandlungsgruppen jeweils im Vergleich zu der Placebogruppe.

Substanz	p-Wert (Log-rank Test) p-Level: 0,05	Signifikanz (Gehan-Breslow-Wilcoxon Test) p-Level: 0,05	Medianes Überleben Δ =Behandlungs-/ Substanzgruppe [d]	Hazardrate
Anle138b ab Woche 30	0,007	0,025	48	3,1
anle138b ab Woche 50	0,032	0,087	38	2,4
sery335b	0,041	0,279	22	2,4
sery383	0,141	0,199	20	1,8
anle253b	0,009	0,051	50	3,1

4. Histologische Ergebnisse

4.1 Aggregation im Gehirn bei terminaler Erkrankung

Das histologische Bild des Hirnstammes ist geprägt von einer hohen Dichte an Neuronen mit ihren Neuriten.

Liegt die Erkrankung PD vor, sind histologisch Veränderungen erkennbar (siehe Abb. 17). Die pathologische Aggregation von α -Synuclein ist im frühen Krankheitsstadium vor allem im Hirnstamm mit Kleinhirn deutlich sichtbar. α -Synuclein Oligomere im Kortex treten erst in einem weiter fortgeschrittenen Krankheitsstadium zutage (siehe Abb. 18). In den Arealen des Gehirns, in denen eine hohe Dichte an Aggregationen vorliegt, sind die Neuriten geschwollen und perlschnurartig angeordnet (siehe Abb. 17). Da α -Synuclein ein synaptisches Protein ist und damit die Anreicherung eher in den Neuriten stattfindet, sind die Perikaryen von diesen Veränderungen deutlich seltener betroffen.

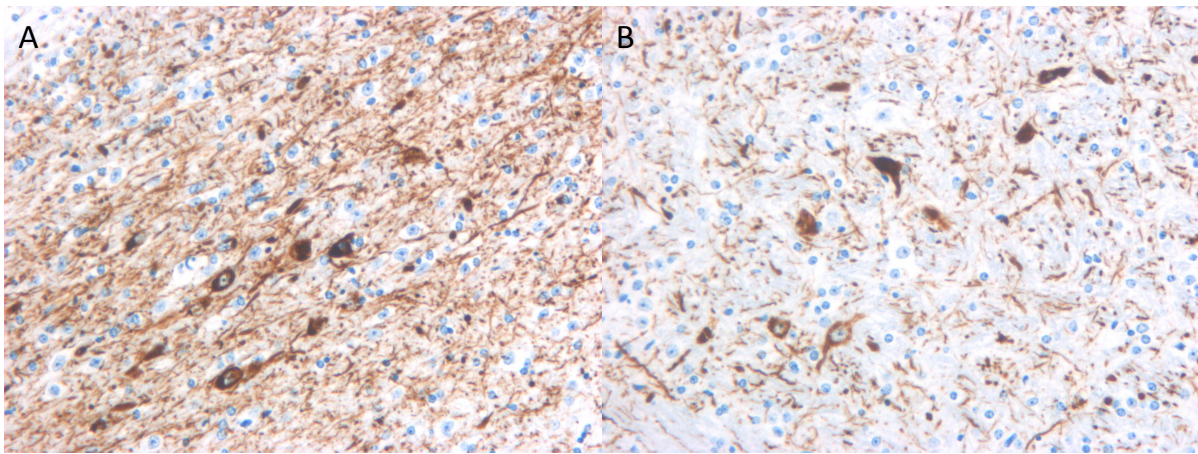


Abb. 17: Immunhistochemie einer terminal erkrankten nicht behandelten Maus zum Todeszeitpunkt im Alter von 440 Tagen. Die Färbung erfolgte mit dem Antikörper 15G7. **A** Schnitt durch das Mittelhirn **B** Schnitt durch den Hirnstamm. 20fache Vergrößerung. Die Neuriten der erkrankten Maus zeigten deutliche α -Synuclein Ablagerungen (dunkelbraun). Man erkennt die für das Krankheitsbild typische neuritische Verdickung und perlschnurartig Anordnung. In den Zellleibern erkennt man nur selten Ablagerungen des aggregierten Proteins.

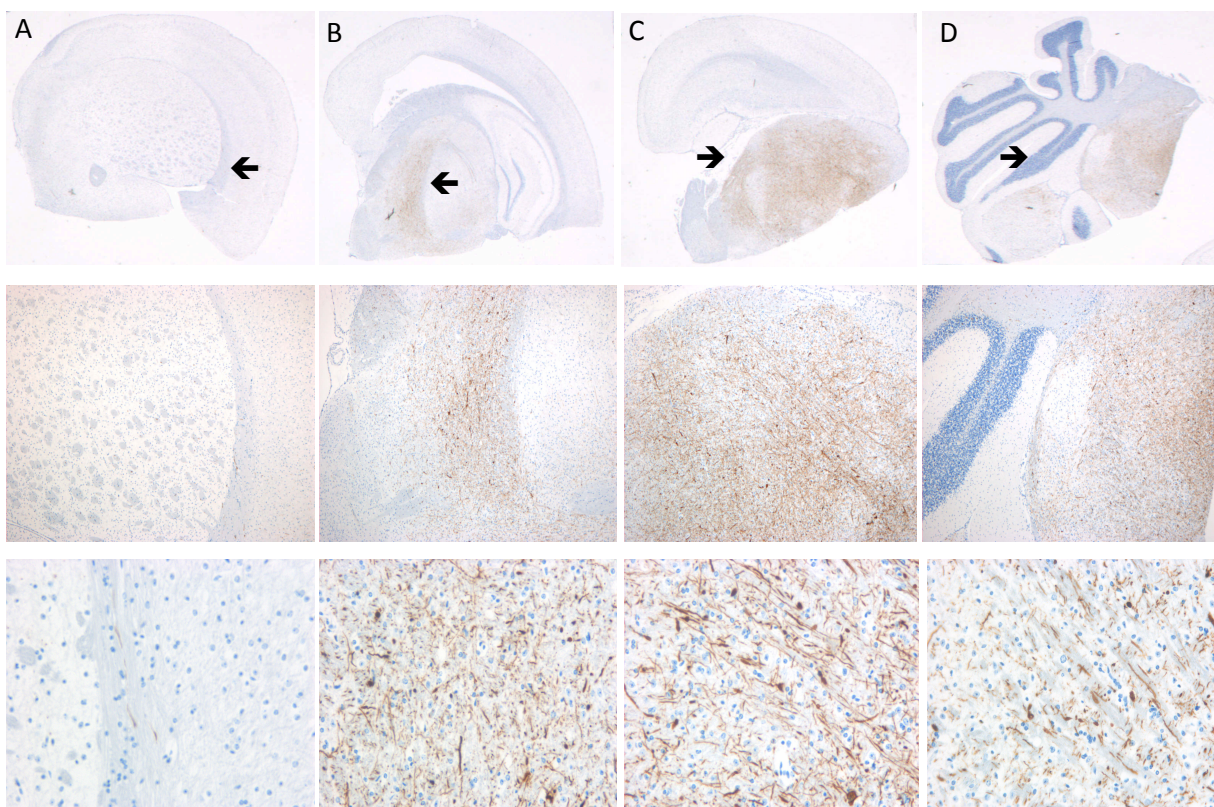


Abb. 18: Immunhistochemie einer Placebo-behandelten Maus zum Zeitpunkt der terminalen Entnahme mit 527 Tagen. Die Bilder sind nach der Lokalisation der Schnitte durch das Mausgehirn von ventral nach dorsal aufgezeigt (Zeile). **A** Frontaler Cortex **B** Mittelhirn **C** Hirnstamm **D** Kleinhirn jeweils Ansicht mit der Lupe, in vierfacher und zwanzigfacher Vergrößerung (in Spalten von oben nach unten). Die Überlebenszeit von 527 Tagen entspricht einer mittleren Überlebenszeit in dieser Gruppe. Die schwarzen Pfeile zeigen das vergrößerte Areal unter dem Mikroskop an. Es zeigte sich eine deutlich vermehrte Ablagerung von α -Synuclein im Hirnstamm und Kleinhirn. Da

die Schnitte bei einer terminal entnommenen Maus angefertigt wurden, sind auch im Kortex vereinzelt Ablagerungen zu sehen.

4.2 Histologische Auswertung der Schnittbilder des Gehirns

Da die Tiere, die zum festgelegten Zeitpunkt von 69 Wochen entnommen wurden, aufgrund der gleichen Lebens- und Behandlungszeit gut vergleichbar waren, wurden diese genauer analysiert. Der Zeitpunkt von 69 Wochen wurde gewählt, da die Tiere mitten im Krankheitsgeschehen waren. Veränderungen im Gehirn waren zu diesem Zeitpunkt auf der einen Seite gut sichtbar, auf der anderen Seite noch modulierbar.

Wie in Abschnitt C.5 beschrieben, wurde zunächst der Hintergrund der Präparate beurteilt um bei Bewertung des Grades der α -Synuclein Ablagerung keine Fehler aufgrund des unterschiedlichen Hintergrunds zu machen. Anschließend wurde beim Mikroskopieren der Gehirnschnitte dieser Tiere drei Grade der α -Synuclein-Aggregat-Pathologie festgelegt und jedes Tier nach Ausprägungsgrad bewertet.

Die Bewertung der α -Synuclein Ablagerungen erfolgte für jede der 69 Wochen alten Mäuse bei jeweils zwei Schnittbildern. Zum einen wurde das Schnittbild betrachtet, das mit dem Antikörper 15G7 gefärbt wurde, zum anderen das Schnittbild, das mit dem dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuclein behandelt wurde (siehe Abb. 19). Die Ergebnisse der beiden Bewertungen der Bilder mit den unterschiedlichen Färbemethoden ergaben dasselbe Grading (siehe Abb. 19). Somit ist sicher, dass bei den Schnitten, die mit Proteinase K und 15G7 behandelt wurden, nur die Oligomere gefärbt wurden.

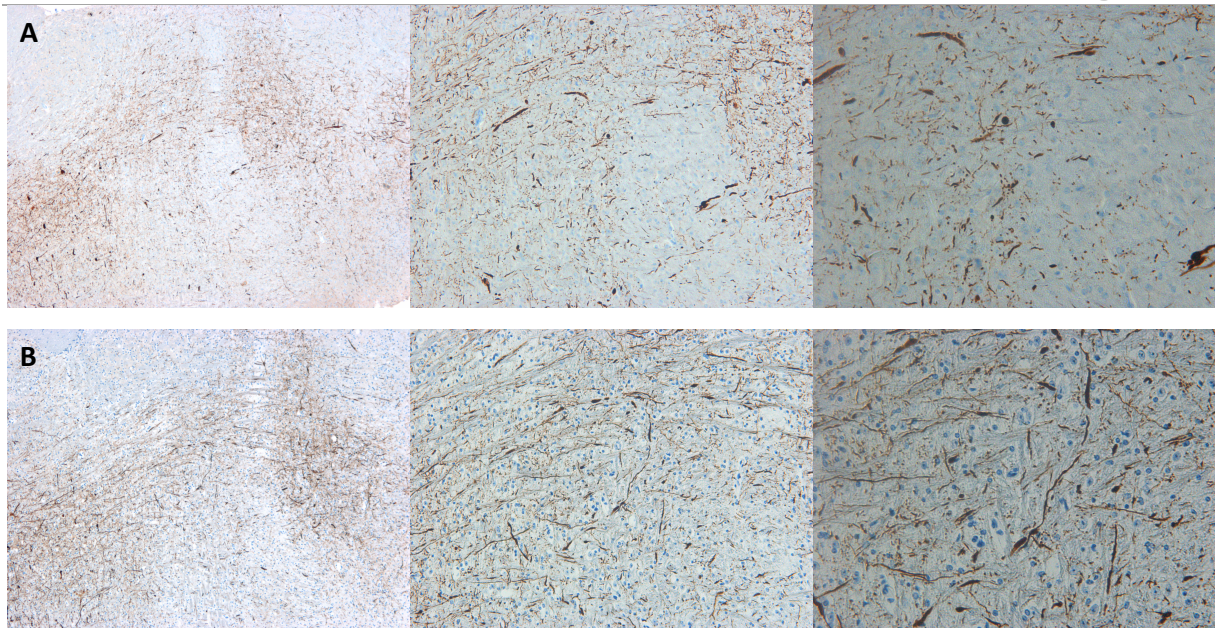


Abb. 19: Histologische Schnitte des Hirnstammes einer mit anle138b behandelten Maus im Alter von 69 Wochen. Von links nach rechts jeweils in 4-facher, 10-facher und 20-facher Vergrößerung **A** Färbung der toxischen α -Synuclein Oligomere mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuclein. Die Färbung erfolgte aufgrund der Phosphorylierung des aggregierten Proteins. **B** Färbung der toxischen α -Synuclein Oligomere nach Vorbehandlung mit Proteinase K durch den humanen Antikörper 15G7. In beiden Schnitten war der gleiche Grad der Aggregation erkennbar. Beide Färbemethoden sind für die Detektion von pathologisch aggregiertem α -Synuclein geeignet.

Bei dem Vergleich der Tiere, die vorherbestimmt mit 69 Wochen aus dem Experiment entnommen wurden, zwischen allen Versuchsgruppen gab es große Unterschiede in der histologischen Ausprägung der α -Synuclein-Aggregat-Pathologie. In keiner Gruppe gab es ausschließliche Tiere mit Grad 1 oder ausschließlich welche mit Grad 3 (siehe Abb. 20)

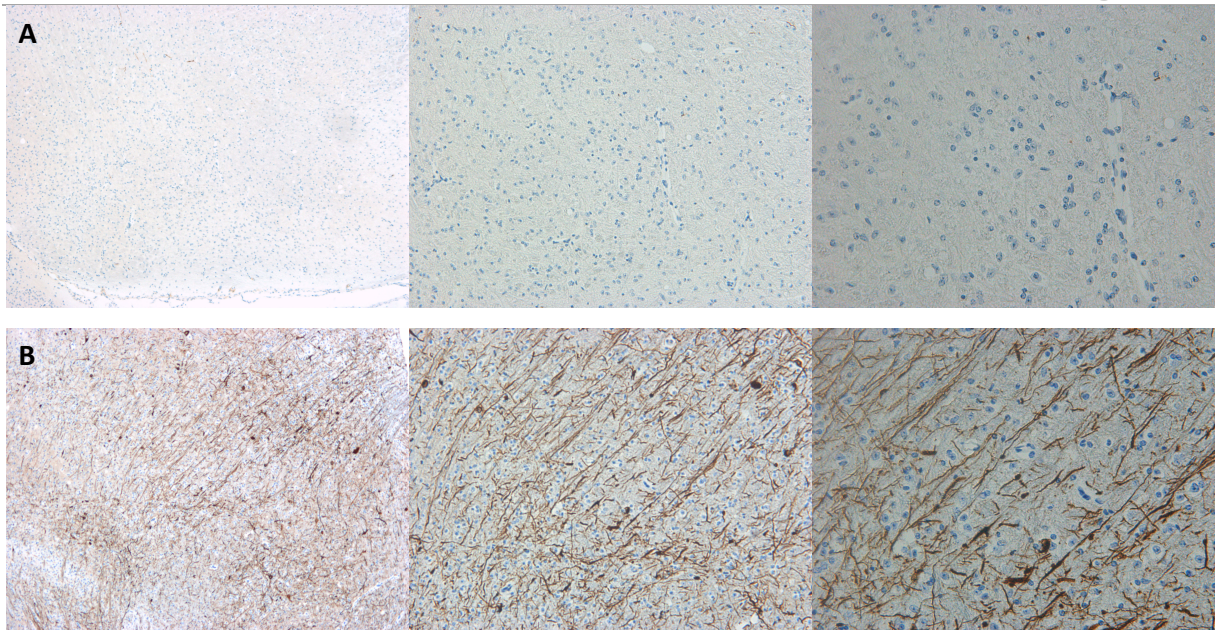


Abb. 20: Histologische Schnittbilder des Hirnstammes von zwei verschiedenen Mäusen. Beide sind 69 Wochen alt und wurden mit anle138b behandelt. Von links nach rechts jeweils in 4-facher, 10-facher und 20-facher Vergrößerung. **A** Maus ohne erkennbare α -Synuclein-Aggregat-Pathologie im Hirnstamm. **B** Maus mit deutlicher α -Synuclein-Aggregat-Pathologie im Hirnstamm. Trotz des gleichen Alters und der gleichen Behandlung waren die Stadien der Erkrankung unterschiedlich.

Auch innerhalb der Versuchsgruppen konnte keine eindeutige Korrelation zwischen der α -Synuclein Aggregation und dem Lebensalter festgestellt werden. Es gab alte Tiere, die einen histologischen Grad 1 hatten und junge Tiere mit histologischem Grad 3. Eine Korrelation war allerdings insofern gegeben, dass alle Tiere, die in der histologischen Untersuchung eine ausgeprägte Pathologie zeigten, auch terminal aus dem Experiment ausgeschieden sind und das unabhängig vom Alter.

4.3 Histologische Auswertung der Schnittbilder der inneren Organe

Beim Mikroskopieren der Präparate von Milz und Nieren zeigte sich bei einigen Tieren eine Veränderung der Organstruktur. Beide Organe zeigten ausgedehnte Gefäßsklerosen (siehe Abb. 21). Organe anderer Tiere zeigten wiederum keine Pathologie. Wenn ein Tier einen pathologischen Befund in der Niere hatte, dann zeigten sich die gleichen Charakteristika in der Milz und vice versa.

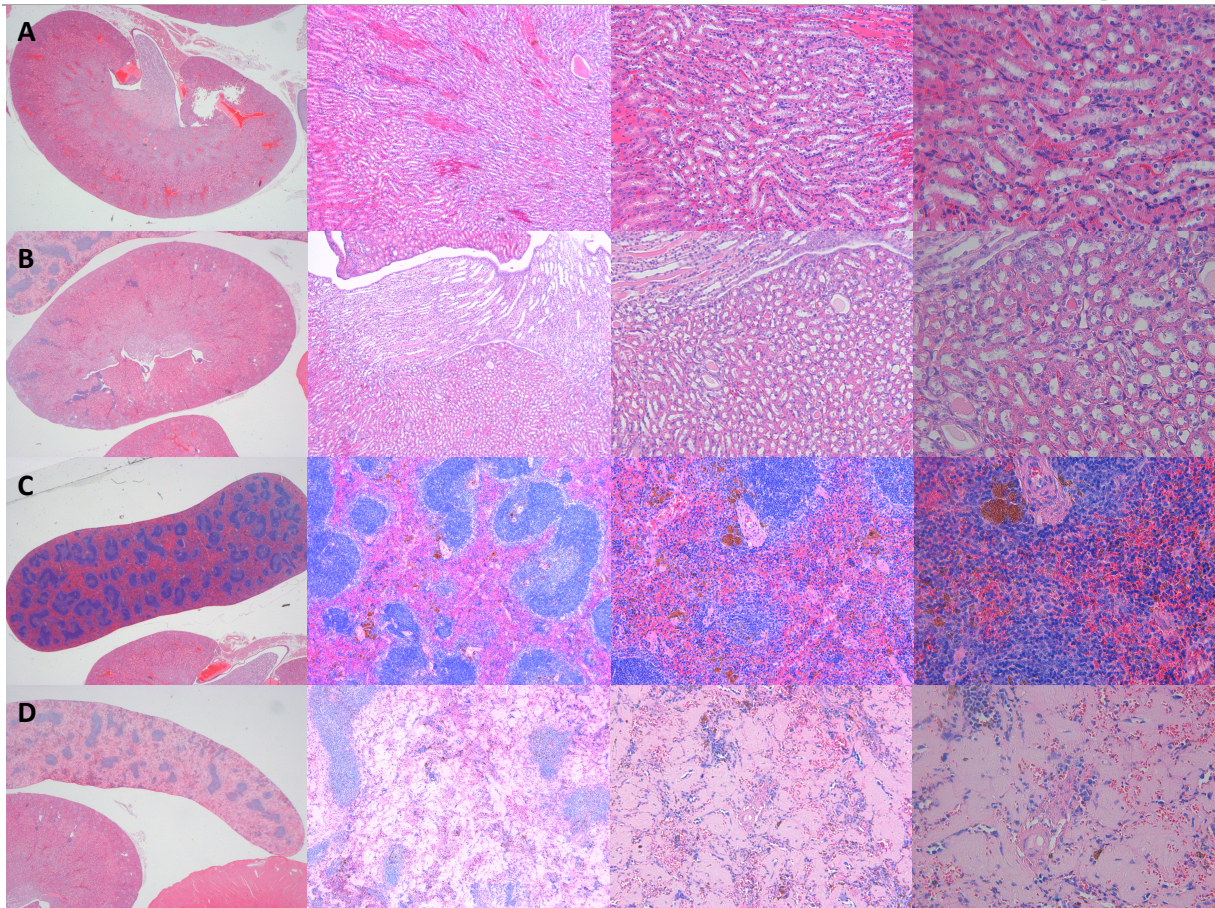


Abb. 21: Histologische Schnittbilder der Nieren und der Milz von zwei verschiedenen Tieren in HE Färbung. Einmal liegen die Organe im gesunden Zustand und einmal im kranken Zustand vor. Von links nach rechts jeweils mit Lupe, in 4-facher, in 10-facher und in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. **A** Gesunde Niere einer Maus im Alter von 79 Wochen und mit anle138b behandelt. **B** Kranke Niere einer Maus im Alter von 78 Wochen und mit anle138b behandelt. **C** Gesunde Milz einer Maus im Alter von 79 Wochen und mit anle138b behandelt. **D** Kranke Milz einer Maus im Alter von 78 Wochen und mit anle138b behandelt. Die gezeigten Tiere waren im Lebensalter und in der Behandlung vergleichbar. Die kranken Organe zeigten eine vermehrte Sklerosierung der Gefäße und eine zerstörte Organstruktur.

Bei der Auswertung der Schnittbilder wurde auf drei verschiedene Parameter Wert gelegt: i) Bei der Untersuchung des Alters der Mäuse im Vergleich zu der Pathologie in Milz und Nieren konnte festgestellt werden, dass die Gefäßpathologie nicht primär altersabhängig war. ii) Vergleich man die Versuchsgruppen untereinander im Hinblick auf das Auftreten der Pathologie, konnte keine Regelmäßigkeit festgestellt werden. Eine Gruppe, in der die Störung besonders häufig auftrat oder gar nicht vorkam, konnte nicht ausgemacht werden. In der Placebogruppe hatten 53,3% Pathologien in der Niere und in der Milz. Dies entsprach dem höchsten Prozentsatz im Gruppenvergleich (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Übersicht über das Auftreten von Gefäßpathologien bei den untersuchten Tieren in den Nieren und in der Milz nach Behandlungsgruppen. In der Placebogruppe traten am häufigsten Gefäßpathologien auf gefolgt von der anle138b Gruppe, die mit 30 Wochen angefüttert wurde. In den übrigen Substanzgruppen sind die Befunde deutlich seltener.

Versuchsgruppe	absoluter Anteil mit Gefäßpathologie	absoluter Anteil ohne Gefäßpathologie	Anteil mit Gefäßpathologie [%]
DMSO	8	7	53,3
anle138b 30 Wochen	7	7	50
anle138b 50 Wochen	5	9	35,7
sery335b	4	10	28,6
sery383	5	10	33,3
anle253b	5	9	35,7

iii) Bei dem Vergleich der Pathologien in den Nieren und in der Milz mit dem histologischen Grading im Gehirn konnte keine Korrelation festgestellt werden. Es gab Tiere, die stark ausgeprägte Pathologien in den Organen und im Gehirn hatten. Andere hatten α -Synuclein-Aggregation im Gehirn, aber keine Gefäßschädigungen an Nieren und Milz und wieder andere Mäuse zeigten Schädigungen an den Organen aber nicht im Gehirn.

5. Nebeneffekte

Während der Laufzeit der Versuche entwickelten wenige Mäuse vorwiegend aus den Substanzgruppen aus ungeklärten Ursachen Läsionen am Fell. Sie mussten aus Tierschutzgründen frühzeitig aus dem Experiment entnommen werden und wurden durch jüngere Nachkommen ersetzt. Die Ersatztiere erfüllten die gleichen Kriterien wie die ursprünglich für das Experiment vorgesehenen Tiere. Sie waren alle weiblich und so nah wie möglich mit den anderen Versuchstieren verwandt. Sie wurden zur im gleichen Alter an die Erdnussbutter gewöhnt und mit den Substanzen behandelt. Auch die

Messungen der motorischen Leistungen und das Gewichtes wurden im selben Alter mit 42 Wochen aufgenommen.

Für die Auswertungen meiner Versuche wurden die Tiere mit Fellläsionen zensiert und mit den neu in das Experiment eingeschleusten Tieren ersetzt.

E. Diskussion

Das Monitoring der motorischen Fähigkeiten war sinnvoll, da es auch beim Menschen eines der ersten klinischen Symptome ist, das als Krankheitszeichen offensichtlich wird (87).

Die vorher festgelegten, nach 69 Wochen entnommenen Mäuse spielten eine besondere Rolle bei der Auswertung der Versuche, da sich zu diesem Zeitpunkt die ersten klinischen Symptome manifestierten. Es war zum einen interessant zu sehen, wie die Histologie und die Klinik korrelierten. Zum anderen dienten die 69 Wochen alten Mäuse als Anhaltspunkt für die Krankheitsprogression in den unterschiedlichen Gruppen. In jeder Versuchsgruppe konnten Tiere des gleichen Alters, mit der gleichen Dauer der Behandlung verglichen werden.

1. Technische Diskussion

1.1 Auswahl der Substanzen

Ziel meiner Arbeit war es, drei Derivate der Substanz anle138b (78, 87) aus der Klasse der Diphenylpyrozole mit nachweislich inhibitorischer Wirkung auf die Prionaggregation *in vitro*, auf ihre Wirkung auf die α -Synuclein-Aggregation *in vivo* und auf krankheitsmodifizierende Effekte *in vivo* zu testen. Anle138b hat in einem vorherigen Tierexperiment zusätzlich zu der Wirkung auf Prionen schon signifikante Wirkung auf die α -Synuclein Aggregation gezeigt. Dieses Ergebnis wurde in meiner Arbeit noch einmal überprüft. Zusätzlich sollte bei der anle138b Gruppe die Wirksamkeit bei später Gabe im Alter von 50 Wochen, in dem Tiere bereits anfangen klinische Krankheitszeichen zu zeigen, überprüft werden.

1.2 Mausmodell

Das transgene Mausmodell mit Expression von A30P-hum- α -syn unter einem neuronalen Promoter (vgl. Abschnitt C.1.2) ist gut etabliert. Dies machte die Vergleichbarkeit meiner Experimente mit Vorangegangenen möglich. Die Mauslinie wurde sowohl international für die Erforschung der α -Synucleinexpression und

-aggregation *in vivo* (103) als auch am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) an der Ludwig-Maximilians-Universität verwendet.

Die in dieses Experiment eingeschlossenen Versuchstiere hatten alle das gleiche Geschlecht (weiblich), waren möglichst nahe verwandt, wurden alle zur gleichen Zeit mit den Substanzen gefüttert und lebten in derselben Umgebung (Temperatur/Tag-Nacht-Rhythmus/Luftfeuchtigkeit/ IVC) welche über die gesamte Dauer des Experiments gleich geblieben ist (vgl. Abschnitt C.1.3- C.1.5). Die Mäuse lebten alle in Einzelkäfigen, um eine gegenseitige Beeinflussung auszuschließen und vor allem um zu gewährleisten, dass alle Tiere die gleiche Menge Substanz zu sich nahmen. Die Anzahl der Tiere war in allen Gruppen mit 15 Tieren pro Gruppe so gewählt, dass eine ausreichende statistische Aussagekraft für die Detektion signifikanter Ergebnisse gewährleistet war.

Die Substanzgruppen wurde mit eine Placebogruppe verglichen, deren Mäuse ebenfalls transgen waren ((Thy1)-h[A30P] α -syn), allerdings keine der Substanzen, die potentiellen inhibitorisch auf die α -Synuclein Aggregation wirken, erhielten. Stattdessen wurden sie nur mit DMSO, dem Lösungsmittel für die Substanzen, in Erdnussbutter gefüttert. Weiterhin wurde eine Gruppe mit Wildtypmäusen unter den gleichen Bedingungen beobachtet und stellte die gesunde Vergleichsgruppe dar. Die Gruppe der Wildtypmäuse wurde von der Mitdotorandin, Catharina Prix, betreut.

1.3 Erhebung der klinischen Daten

Bei der Erhebung der klinischen Daten wurde das RotaRod als Messgerät zur Ermittlung der motorischen Fertigkeiten der Mäuse verwendet. Diese Methode ist lange etablierte am ZNP. Es wurde nicht nur für die Überprüfung der Laufleistung bei PD-Mausmodellen verwendet, sondern auch für die Beurteilung der Motorik bei Modellen anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Hirntumormodellen.

Die Ermittlung der Laufleistung mittels RotaRod wird vielfach praktiziert und ist ein wissenschaftlich anerkanntes Verfahren (73).

Die Einstellung der Umdrehungszahlen des RotaRod und der absoluten Zeit, die die Mäuse maximal auf der Walze laufen konnten, bis sie aufhörte sich zu drehen, variierte an Mess- und Trainingstagen (vgl. C.2.2.1). Diese Daten wurden vorher anhand von Beobachtungen und Erfahrungen aus früheren Experimenten festgelegt (87).

1.4 Histologische Beurteilung

Die Aufarbeitung und Färbemethoden der Mausepräparate gehörte größtenteils zur klinischen Routinediagnostik in medizinischen Zentren. Zur Kenntlichmachung der α -Synuclein Aggregationen im Gehirn der Tiere wurden zur Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit zwei verschiedene Färbemethoden gewählt (vgl. Abschnitt C.5). Vor der Bewertung der Aggregationen mit den eben genannten Schnitten wurde der Hintergrund aller Präparate bewertet. Der unterschiedlich ausgeprägte Hintergrund der Schnitte kam durch unspezifische Färbungen zustande. Unterschiede im Hintergrund konnten zum Beispiel aufgrund unterschiedlicher Färbechargen zustande kommen. Ist der Proteinaseverdau nicht exakt identisch, die Zeit oder die Temperatur während der Färbung geringfügig unterschiedlich, resultierten leicht unterschiedliche Hintergrundfärbungen.

Durch Beurteilung der Bilder mit zwei Färbemethoden war man sicher, die richtigen Ergebnisse zu bekommen.

Ausnahmslos alle Tiere wurden histologisch untersucht. Die Ergebnisse der Gehirnschnitte zeigten, dass alle Tiere mit α -Synuclein Aggregationen bei ihrem Tod terminal krank waren (vgl. Abschnitt D.4.2). Eine weitere Korrelation etwa zwischen dem Stadium der Pathologie und dem Alter der Tiere oder ein Zusammenhang zwischen der Substanzgruppe und der Pathologie konnten nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise waren die Gruppengrößen mit 15 Tieren zu klein um eine nachweisliche Korrelation zwischen Lebensalter und Histologie herstellen zu können.

Das Auftreten der Gefäßpathologie in den Nieren und in der Milz wurde ebenfalls in allen Tieren untersucht und in den einzelnen Versuchsgruppen noch einmal genau auf Zusammenhänge mit den Substanzen geprüft. Es konnte jedoch auch hierbei keine Korrelation zwischen der Gefäßpathologie und den Substanzen festgestellt werden. Tatsächlich zeigte die Placebogruppe die höchste Rate an Tieren mit der Pathologie (vgl. Abschnitt D.4.3). Auch zum Alter oder zu der Gehirnpathologie war keine Korrelation auszumachen. Die Genese ist unklar, die auftretenden Pathologien galten als prinzipieller Störfaktor. Um in dieser Sache mehr Klarheit zu gewinnen, wären eventuell ebenfalls größere Gruppengrößen notwendig.

2. Diskussion der getesteten Substanzen

Grundsätzlich wurden bei der Diskussion der Ergebnisse zwei Aspekte beleuchtet.

Zum einen ging es um die verschiedenen Substanzen und deren Wirksamkeit gegenüber der Placebogruppe und untereinander.

Zum zweiten wurde den Ergebnissen der anle138b Gruppe, die erst nach 50 Wochen die Substanz bekommen hatte, besondere Beachtung geschenkt.

2.1 Vergleich der Substanzgruppen

2.1.1. Anle138b bei Substanzgabe nach der 30. Lebenswoche

Als einzige meiner Gruppen wurde anle138b mit Substanzgabe ab der 30. Lebenswoche schon in einem Vorgängerexperiment am ZNP getestet (87). Die dort ermittelten Ergebnisse dieses ersten Versuches ergaben eine Reduktion der Fluktuationen in der Motorik, eine Gewichtsentwicklung ähnlich zu den gesunden Tieren und später einsetzende Symptome als bei unbehandelten transgenen Mäusen (87). Diese Ergebnisse ließen sich in meinem Experiment reproduzieren.

Im Vergleich zu der Überlebenszeit der Placebogruppe ergab sich im Log-rank Test ein signifikanter Unterschied ($p=0,007$), die mittlere Überlebenszeit war mit 553 Tagen um 48 Tage länger als bei der Placebogruppe. Dies entspricht einer verlängerten Überlebenszeit von knapp 10%. Auf das durchschnittliche Lebensalter eines Menschen von circa 80 Jahren umgerechnet, wäre ein acht Jahre längeres Leben ein enormer Fortschritt. Auch das symptomfreie Überleben war deutlich länger als bei der Placebogruppe.

Der Gewichtsverlust, der als klinisches Zeichen für die beginnende Symptomatik gesehen wurde, setzte bei der anle138b Gruppe erst zwei bis vier Wochen vor dem Tod ein, während die Tiere aus der Placebogruppe teilweise schon sechs Wochen vor ihrem Ableben deutlich an Gewicht verloren hatten.

Auch dieses Ergebnis sprach dafür, dass die potentielle Therapie mit anle138b beim Menschen eine Erleichterung der Krankheit mit sich bringen würde, da ein verlängertes Überleben ohne belastende Krankheitssymptome möglich wäre. Diese würden bei gleichem Krankheitsverlauf wie bei den Mäusen erst kurz vor dem Tod auftreten.

An den Gewichtsdiagrammen war deutlich zu sehen, dass das Gewicht der nach 69 Wochen geplant entnommenen Mäuse vor dem Entnahmezeitpunkt weder stieg noch fiel, sondern innerhalb der normalen Fluktuationen konstant blieben (siehe Abb.13).

Dies deutet darauf hin, dass die entsprechenden Tiere noch nicht in dem Stadium der Krankheit waren, da die Gewichtsabnahme als klinisches Krankheitszeichen zu beobachten ist.

Die nachweisliche Hemmung der α -Synuclein-Aggregation im Gehirn der Mäuse sprach dafür, dass das längere symptomfreien Überleben durch die Reduktion der Aggregationen zustande kam. Die Tiere dieser anle138b Gruppe lebten im Durchschnitt 29 Tage länger, ohne Symptome zu entwickeln, als die Tiere der Placebogruppe. Dies zeigte sich auch in den Kaplan-Meier-Kurven (siehe Abb. 13 und Abb. 14).

Trotz der Ergebnisse von anle138b im Tierexperiment ist es wichtig für eine eventuelle klinische Studie, eine Ausweichpräparat zu haben, welches bei unerwarteten Nebenwirkungen die Kandidatensubstanz zur Medikamentenentwicklung ersetzen könnte. Außerdem besteht immer die Möglichkeit, dass eine *in vitro* nicht so wirksame Substanz *in vivo* deutlich bessere Ergebnisse zeigt. Dafür wurden drei weitere Substanzen getestet (vgl. Abschnitt D.1.3)

2.1.2 Sery335b

Der Unterschied zwischen sery335b und anle138b lag in der Strukturformel der beiden Moleküle. Die Strukturformel von sery335b hat in R3 Position ein Chlorid-Ion in meta-Position, bei anle138b nahm ein Bromid-Ion diese Position ein, abgesehen davon waren beide Moleküle identisch (vgl. Abschnitt B.5.1.2).

Es stellte sich die Frage welches Halogen als Substituent die bessere Alternative für die Anwendung am Menschen darstellen würde (vgl. Abschnitt E.3.3.1).

Die Tiere, die mit sery335b behandelt wurden, zeigten eine durchschnittlich verlängerte Überlebenszeit von 22 Tagen (siehe Tab.4) und gegenüber der Placebogruppe im Log-rank Test ein signifikantes Ergebnis ($p=0,041$)

Der Gewichtsverlust trat wie bei der anle138b Gruppe circa zwei bis vier Wochen vor dem Ableben der Mäuse ein.

2.1.3 sery383

Für sery383 zeigte keiner der beiden durchgeführten statistischen Tests, weder der Log-rank, noch der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test einen signifikanten Wirkungsunterschied

im Vergleich zur Placebogruppe. Die mittlere Überlebenszeit der Tiere dieser Gruppe betrug 525 Tage, war damit nur 20 Tage länger als die der Placebogruppe und war für die absolute Verlängerung der Überlebenszeit am wenigsten wirksam.

Die Kaplan Meier Analyse ergab, dass die sery383 Gruppe für das Langzeitüberleben von PD einen geringeren Effekt hatte als die übrigen Substanzgruppen (siehe Abb. 15 und Abb.16).

Die Gewichte der Mäuse fielen durchschnittlich zwei bis vier Wochen vor ihrem Tod ab, was dem durchschnittlichen Zeitpunkt aus den anderen Substanzgruppen entsprach.

Die Substanz sery383 ist, wie sery335b, in R3 Position mit einem Chlorid-Ion als Substituenten in meta-Position designiert. Der Unterschied zu sery335b besteht in R1 Position, anstelle von 1,3-Benzodioxole ist hier Benzolamin angehängt, ein primäres Amin.

Schon bei den *in vivo* Versuchen mit Prion-infizierten Mäusen ergab sich lediglich eine Inhibition von 31%. Dies war im Vergleich zu den drei anderen Substanzen geringer. Anle138b wies 120 Tage nach Infektion mit Prionen und 40 Tage langer oraler Behandlung mit der Substanz (1mg) eine Inhibition von 78% auf, sery 335b 68% und anle253b 59% (siehe Tab. 2). Wie oben beschrieben ist es aber immer potentiell möglich, bei einem neuen Experiment, hier die Untersuchung der Aggregationshemmung von α -Synuclein, andere Ergebnisse zu bekommen. Sery383 war außerdem Stellvertreter der Substanzen, die in R1 Position einen anderen Substituenten als 1,3-Benzodioxol hatten.

2.1.4 Anle253b

Für die Substanz anle253b ergaben ebenfalls nur der Log-rank Test eine statistische Signifikanz ($p=0,009$) (vgl. Tab.4). Dies mag daran liegen, dass die Todeszeitpunkte am Anfang der Graphen eher ähnlich sind und erst im Laufe des Experimentes variierten. Da der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test mehr Gewichtung auf die Anfangswerte legt, kommt man zu diesem Ergebnis.

Die mittlere Überlebenszeit war allerdings um 50 Tage länger als die, der Placebogruppe und lag mit 555 Tagen im Durchschnitt sogar noch über der durchschnittlichen Überlebenszeit der früh gefütterten anle138b Gruppe mit 553 Tagen. Außerdem gab es in dieser Gruppe Tiere, die überdurchschnittlich lange überlebten. Es scheint, als würden die Substanzen anle253b und anle138b am besten gewährleisten das Überleben der Tiere zu verlängern.

Die Gewichtsentwicklung war ähnlich der anderen Substanzgruppen, auch dabei entfaltet anle253b eine Wirkung bezogen auf ein längeres symptomfreies Überleben.

Genau wie sery383 hatte auch anle253b in den Vorversuchen einen Wert, der stark von denen der anderen Substanzen abwich (siehe Tab. 2). Anle253b hatte mit 2,1 nmol/g eine geringe Konzentration im Gehirn. Anle138b hatte eine Konzentration von 34,1 nmol/g und sery335b eine Konzentration von 29,6 nmol/g (87). Trotzdem ergaben sich vor allem in den *in vitro* Tests mit Prionen sehr gute Ergebnisse von 80% Inhibition der Prionaggregation.

Anle253b unterscheidet sich in der Strukturformel wie sery383 durch die R1 Position von anle138b. Hier ist an Stelle des 1,3-Benzodioxols, ein tertiäres Amin.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle Substanzen außer sery383 einen lebensverlängernden Effekt auf die behandelten Tiere hatten. Sie zeigten unterschiedlich gute Ergebnisse, jedoch war das Eingreifen in den Pathomechanismus von PD bei allen Substanzen ungefähr gleich. Es ist möglich, sowohl das Überleben zu verlängern als auch länger symptomfrei mit der Krankheit zu leben. Der Krankheitsverlauf ist lange konstant, bevor die Tiere in kürzester Zeit terminal krank werden.

Diese Beobachtungen sind vielversprechend im Hinblick auf die Therapie von PD. Die Substanzen haben das Potential, eine kurative Behandlung darzustellen und könnten im nächsten Schritt zu einem Medikament entwickelt werden.

2.2 Anle138b bei Substanzgabe nach der 50. Lebenswoche

Aus vorhergehenden Experimenten war bekannt, dass anle138b auch bei Therapiebeginn nach Eintreten der ersten Symptome bei Prionerkrankungen ein verlängertes Überleben bewirkt (87).

Dies ist ein wichtiger Parameter für die Anwendung beim Menschen, da die Diagnose aufgrund von klinischen Parametern gestellt wird.

Der Beginn der Symptome von PD bei den transgenen Mäusen in meinem Experiment liegt bei 300 Tagen. Bei nicht behandelten transgenen Mäusen wurden zu diesem Zeitpunkt schon erste Krankheitssymptome auffällig. Dazu gehörten die Fluktuationen in der Motorik, die mithilfe der RotaRod Messung erhoben wurden und die fehlende weitere Gewichtszunahme ab der 50. Woche. Diese zwei frühen klinischen Symptome waren in vorangegangenen Versuchen identifiziert worden (104). Weiterhin sind bei unbehandelten Tieren im selben Alter auch im histologischen Schnittbild erste vereinzelte Ablagerungen erkennbar.

Die anle138b Dosis bei Mäusen die ab der 50. Woche damit gefüttert wurden, blieb gleich (vgl. Abschnitt C.1.4).

Auch bei der späteren oralen Gabe von anle138b nach der 50. Lebenswoche anstelle der Gabe nach der 30. Lebenswochen war ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf zu beobachten.

Die Auswertung ergab im Log-rank Test im Vergleich zur Placebogruppe ein signifikantes Ergebnis ($p=0,032$) und eine verlängerte mittlere Überlebenszeit von 543 Tagen. Das symptomfreie Intervall verlängerte sich um 39 Tage im Vergleich zu der Placebogruppe (vgl. Tab.3).

Dies zeigt, dass die Anfütterung mit der Substanz zu einem späteren Zeitpunkt nur eine marginal geringere Wirksamkeit hatte als bei der Anfütterung nach der 30. Lebenswoche. Da die Gruppe mit späterer Substanzgabe 20 Wochen weniger lang behandelt wurde, scheint der aggregationshemmende Effekt von anle138b umso größer zu sein. Vergleicht man die frühe und die späte anle138b Gruppe im Log-rank Test, kann man keine signifikanten Unterschiede ausmachen ($p=0,35$). Bei der später therapierten Versuchsgruppe kann anle138b genauso in der Krankheitsverlauf eingreifen wie in der

früher therapierten Gruppe und sogar die beginnende Aggregation aufhalten (vgl. Tab 3 und 4).

Aufschlussreich ist der Vergleich der Auswirkungen der Behandlung nach Krankheitsausbruch bei PD, einer Synucleinopathie, und Prionerkrankungen. Der wesentliche Unterschied in der Pathogenese der beiden Erkrankungen liegt darin, dass die Tiere im Prionversuch mit den krankhaften Proteinen, Prion Protein Scrapie (PrP^{Sc}), infiziert werden (87). Die Versuchstiere, die im Laufe ihres Lebens an PD erkranken, haben einen Gendefekt, der die Krankheit schließlich auslöst. Bei den mit mit PrP^{Sc} infizierten Mäusen ist der Krankheitsverlauf sehr schnell. Es kommt nahezu zu einer exponentiellen Verschlimmerung der Krankheit. Daher sind die Tiere, je später man mit der Behandlung mit den Substanzen beginnt, immer kränker.

Bei PD treten die Aggregation von α -Synuclein und damit auch die einhergehende Symptome deutlich später ein. Die Therapie kann erst dann ihre Wirkung entfalten, wenn die Krankheit ausgebrochen ist. Die Wirkung der späten Substanzgabe tritt also bei den Synucleinopathien deutlich später ein. Dass sie dabei trotzdem den aggregationshemmenden Effekt entfaltet, macht sie wieder umso wirksamer.

Vor allem der schon angesprochene klinische Nutzen wird enorm vergrößert, da die Behandlung erst nach den ersten Symptomen begonnen werden kann.

Ein weiterer Aspekt, der ebenfalls durch die Ergebnisse der anle138b-Gruppen mit unterschiedlichen Therapiezeitpunkten zutage tritt, lässt Rückschlüsse auf die Pathogenese der Synucleinopathien zu. Es wurde vermutet, dass die Nervenzellen zu frühen Zeitpunkten in der Erkrankung weniger anfällig sind für die Aggregation von pathologischen Proteinen. Diese These konnte durch die frühe Behandlung mit anle138b widerlegt werden, indem auch bei den Versuchen eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten und ein Halten des Gewichtes gegenüber Kontrollgruppen nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt D.1.2 und D.2.1).

Als Hauptwirkungsmechanismus wurde der aggregationshemmende Effekt der Substanzen bestätigt.

3. Struktur-Wirkungs-Verhältnisse der DPP im Experiment

3.1 Die Rolle der Halogenide in R3 Position

Geht man noch einmal genauer auf die unterschiedlichen Ergebnisse der Versuchsgruppen meines Experimentes ein, lässt sich die These aufstellen, dass die Substituenten an das Referenzmolekül anle138b, einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit der Substanz gegen die α -Synuclein-Aggregation haben.

Wie im Ergebnisteil beschrieben ergab die SAR Analyse für anle138b und seine Derivate, dass Bromid in meta-Position aus sterischen Gründen die höchste Aktivität besitzt; tauscht man Bromid in meta-Position gegen ein anderes Halogen aus, zeigt sich eine Korrelation mit der Größe des Substituenten (87). Halogene mittlerer Größe, Chlor und Brom, haben eine höhere inhibitorische Aktivität als das kleinere Fluor oder das größere Iod.

Halogenverbindungen wurden erst kürzlich als potentiell, vielversprechendes biochemisches Element für die Entwicklung neuer Medikamente wiederentdeckt (105). Seit gut 70 Jahren gibt es die ADMET-Kriterien (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity), die für die Optimierung von Medikamenten herangezogen wurden (117, 118). Halogenverbindungen wurden bisher zur Verbesserung der oralen Aufnahme und Erleichterung der Passage von biologischen Barrieren verwendet. Sie verlängern die Wirkdauer des Medikamentes, indem sie kleine hydrophobe Hohlräume in Zielproteinen füllen.

Halogene sind elektronenreiche, lipophile Atome (105). Diese Eigenschaften wurden sich bei dem NBB Präparat 306H03 gegen die Aggregation von α -Synuclein zunutze gemacht (9). Bei den Versuchen wurden NBBs entweder mit Hydroxylgruppen als Substituenten oder einer Chloridgruppe als Substituenten gegeneinander getestet. Die Substanz mit der Chloridgruppe hatte eine deutlich verbesserte Zellpermeabilität aufgrund der reduzierten polaren Oberfläche und der Zunahme der Hydrophobie (9).

Neuesten Erkenntnissen zu Folge haben Halogene neben ihren Eigenschaften als Lewis-Base auch die Charakteristik der Lewis-Säuren Elektronen aufzunehmen. Diese Eigenschaft wird durch sogenannten δ -Löcher gewährleistet, die eine Region mit

positiven Ladungen zwischen den Regionen mit überwiegend negativen Ladungen darstellt (98). δ -Löcher kommen aufgrund der Anisotropie zustande. Sie üben dadurch einen stabilisierenden Effekt auf andere elektronegative Atome wie etwa Sauerstoff oder Stickstoff aus (106). Das elektrostatische Potential der Halogenatome, durch die δ -Löcher elektronegative Atome anzuziehen, steigt mit der Größe der Halogene von Fluor zu Iod. Durch stark elektronegative Teile wird die Polarisierung der Halogene zusätzlich verstärkt. Allgemein verbessern Halogenatome die Interaktion mit Proteinen.

Diese neuen Erkenntnisse sind der Hauptgrund für das hoch eingeschätzte Potential der Halogene als Therapeutikum.

In den von mir getesteten Substanzen kommt in anle138b Brom in R3 Position vor, in sery335b Chlor in R3 Position. Beide Substanzen zeigten deutliche Effekte auf die Aggregation des Proteins α -Synuclein (vgl. D.1.2). Da Brom das größere Halogen darstellt würde man theoretisch erwarten, dass anle138b einen höheren inhibitorischen Effekt auf die Aggregation von α -Synuclein hat als sery335b.

Außerdem gilt, dass sowohl die Energie der Verbindung zwischen dem Halogen und dem elektronegativen Teil als auch die Direktionalität der Verbindung von Fluor zu Iod zunimmt und damit die These weiter stützt. Dies liegt daran, dass Fluor nur ein kleineres δ -Loch aufweist (107). Die Vermutung dass Bromverbindungen potenter sind als Chlorverbindungen konnte auch *in vivo* nachweisen werden.

3.1.1 Halogene in neuen Medikamenten

Um die Spezifität einzelner Halogene für die Wirksamkeit eines Medikaments zu untersuchen, liegen Ergebnisse aus der Krebsforschung vor. Substrate mit Halogenverbindungen spielen eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Proteine, die für die Kanzerogenese verantwortlich sind (105).

In einer der neuesten Studien wurde ein iodierter gegenüber einem chlorierten Inhibitor getestet, die beide unterschiedliche Proteinkinasen inhibieren sollten. Hier zeigte sich eine erhöhte Spezifität der iodierten Struktur gegenüber der Proteinkinase. Die Spezifität eines neuen Medikaments an das zu behandelnde Protein kann also an einer zu geringen Bindung liegen. Es ist möglich, durch das Design der potentiellen

neuen Substanz die Affinität an den Liganden, in diesem Fall an Tumorproteine, zu erhöhen (105).

Bezüglich der Affinität der halogenierten Substanzen zu ihren biologischen Gegenspielern gibt es für unterschiedliche Proteine unterschiedliche Ergebnisse. In einer weiteren Studie wurde herausgefunden, dass die inhibitorische Wirkung von iodhaltigen Verbindungen auf das Protein p53, das in vielen entarteten Zellen gefunden wird, deutlich geringer ist als die der anderen drei Halogene (108).

Als sicher gilt allerdings, dass halogenierte Verbindungen mit inhibitorischer Wirkung in Medikamenten gegenüber Wasserstoffverbindungen vorteilhafter sind, da sie eine deutlich höhere stabilisierende Wirkung haben (109).

Diese Tatsache wurde bei der Auswahl meiner Substanzen schon berücksichtigt. Es wurden nur Derivate mit Halogenverbindungen getestet.

3.2 Der Einfluss von Aminen auf die Pharmakokinetik

Da zwei der getesteten Substanzen Aminogruppen an R1 Position haben, ist die Fragestellung zu der Verstoffwechselung dieser Substituenten interessant. In Sery383 liegt ein primäres Amin vor, in anle253b ein tertiäres Amin.

Die Basizität der Amine nimmt von den primären zu den tertiären Aminen zu, da die Alkylgruppen die Elektronendichte auf dem Stickstoffatom konzentrieren.

Tertiäre Amine in Arzneimitteln, wie es in anle253b der Fall wäre, liegen im physiologischen pH-Bereich in zwei unterschiedlichen Formen vor. Durch Dissoziation liegt die eine Form positiv geladen vor, die andere ungeladen. Letztere Form ist aufgrund der Lipophilie eher die Transportform, die hydrophile Form eher die Wirkform, die an Rezeptoren bindet. Bei pharmakokinetischen Messungen kann immer nur die Blutkonzentration ermittelt werden, man kann nicht zwischen den beiden Formen unterscheiden. Weiterhin kann sich das Gleichgewicht der beiden Substanzen unter den Bedingungen der Alkalose oder Azidose verschieben, was die Vorhersehbarkeit der Wirkung einschränkt.

Nach der Systematik des international anerkannten LADME-Metabolismus (117), erfolgt zunächst die Freisetzung der Substanz (Liberation). Durch die lipophilen Eigenschaften der Amine werden sie nach oraler Einnahme fast vollständig resorbiert. Bei der

Absorption kommt allerdings auch der First-Pass-Effekt in der Leber zum Tragen, bei dem die Substanz schon teilweise metabolisiert wird, bevor sie das erste mal den großen Kreislauf erreicht. Dies führt dazu, dass die Bioverfügbarkeit nie 100% betragen kann. Nach der Resorption der Substanzen im Magen und im Darm und Eintritt durch die Pfortader in die Leber erreichen sie den großen Kreislauf (Distribution und Metabolism) (118). Von dort müssen sie die Blut-Hirn-Schranke passieren, da die untersuchten Substanzen im Gehirn wirken sollen. Hier gilt, dass lipophile Substanzen eine gute Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit haben, hydrophile Substanzen nicht. Anle253b hat mit 2,1 nmol/l eine fünfzehnfach geringere Gehirnkonzentration als die anderen Substanzen (vgl. B. 5.1 Tab. 2). Als tertiäres Amin liegt sie auch in protonierter Form vor und hat daher einen hydrophileren Charakter als primäre Amine.

Quantifizieren lässt sich dieser Effekt bei Betrachtung des pKs-Wertes. Er beträgt für ein primäres Amin (MeNH_2) 10,64, für ein tertiäres Amin (Me_3N) 9,79. Im Gehirn entfalten die Wirkstoffe ihre aggregationshemmende Wirkung. Über den großen Blutkreislauf gelangen Amine in die Niere und werden dort eliminiert und mit dem Harn ausgeschieden.

4. Einordnung in den Kontext

Morbus Parkinson ist eine seit Anfang des 19. Jahrhunderts bekannte Krankheit (119). Seit jeher wird versucht sie möglichst erfolgreich zu therapieren und positiven Einfluss auf die Symptome zu nehmen. Dies sind neben den vier Kardinalsymptomen Rigor, Tremor, Akinesie und posturale Instabilität (6) auch viele nicht motorische Dysfunktionen (vgl. B.2). Dazu zählen gastrointestinale Störungen, Schlafstörungen, neuropsychiatrische Symptome (Depression), Psychosen und kognitive Dysfunktionen (41).

Bis heute ist es nicht gelungen PD kausal zu therapieren (13). Vorwiegend die motorischen Symptome können auf unterschiedliche Weise mal mit mehr, mal mit weniger großem Erfolg, je nach Ansprache der Patienten auf die Medikation, abgeschwächt und zeitweise eliminiert werden (vgl. B.2.3).

Die gängigen Präparate, um PD symptomatisch zu behandeln, sind unter anderem MAO-Inhibitoren, NMDA Antagonisten, Dopamin Agonisten und L-Dopa (vgl. B. 2.3). Der

Beginn des Krankheitsausbruches und der weitere Verlauf der Erkrankung können dadurch nur teilweise beeinflusst werden (41).

Von den genannten Präparaten ist Levodopa das effektivste und am besten verträglichste Medikament, um die motorischen Defizite auszugleichen (13, 41). Als Vorstufe von Dopamin kann es die Blut-Hirn-Schranke passieren, wird dort zu Dopamin umgewandelt und gleicht so den Dopaminmangel aus.

Da, soweit man heute weiß, die Ursache des Dopaminmangels auf das Sterben der dopaminproduzierenden Zellen zurückzuführen ist, was wiederum durch die Aggregation falsch gefalteter Proteine bedingt ist (120), ist die Substitution von Dopamin nicht geeignet, um kausal PD zu therapieren.

Fortschritte in der Entwicklung neuer kausal therapeutischer Medikamente erlangen mit der steigenden Zahl der Parkinsonpatienten somit immer größere Bedeutung, um die Lebensqualität aller Betroffenen zu verbessern (121).

Der Weg dorthin führt unweigerlich darüber, die molekularen Ursachen für die krankmachende Aggregation zu entdecken und dabei Ansatzpunkte zu finden, die in den Pathomechanismus eingreifen und das Fortschreiten der Krankheit stoppen.

Man ist sich mittlerweile einig, dass α -Synuclein eine zentrale Rolle bei der Entstehung von PD spielt (87, 66, 120). Aggregiertes α -Synuclein ist die Hauptkomponente der LB, die schon zu Beginn der Erkrankung als Zelleinschluss im Zytoplasma verschiedener Neuronen vorliegen (9).

Die physiologische Funktion von α -Synuclein ist nicht gesichert, es gibt jedoch Thesen, die besagen, dass α -Synuclein eine Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung am synaptischen Spalt spielt, da es eng mit der Lipidmembran der Zellen und den synaptischen Endplatten assoziiert ist (122).

Im Gegensatz dazu gilt als sicher, dass intrazellulär aggregiertes α -Synuclein in vielen neurodegenerativen Erkrankungen, den α -Synucleinopathien, die Ursache für Dysfunktionen ist (123).

Mit den Ursachen, den Folgen und dem Verständnis des Pathomechanismus haben sich viele Arbeitsgruppen beschäftigt, mit dem Ziel, die Aggregation von α -Synuclein zu inhibieren. Obwohl oder gerade weil es immer noch verschiedene Hypothesen gibt, was genau bei der Aggregation passiert, haben die verschiedenen Forschungsgruppen unterschiedliche Methoden entwickelt um diese zu stoppen.

Abschnitt B. 4 gab einen kurzen Überblick über mögliche Ansatzpunkte, nun sollen einige vertieft werden, um die Vielzahl, aber auch die Komplexität der Materie zu verdeutlichen.

Geldanamycin bzw. dessen Derivat 17-AAG (17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin) wird aktuell in klinischen Studien als Antikrebsmedikation getestet (124). Es bindet spezifisch an das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) (125) und beeinflusst die Aktivität desselben z.B. in Mammazellen (126).

HSP spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung, der Translokation und bei Transportprozessen. Sie fungieren auch als molekulare Chaparone und überführen falsch gefaltete Proteine zu den Proteasomen, an denen diese mit Ubiquitin markiert werden, um dann abgebaut zu werden (124). 17-AAG dient also der Unterstützung des Abbaus von Proteinen, die mutiert sind, vor allem durch die Hochregulierung der HSP.

Eine neue *in vitro* Studie zeigt, dass 17-AAG die Autophagozytose falsch gefalteter Proteine induziert. Es kann somit α -Synuclein Aggregate abbauen. Beim Abbau der toxischen Aggregate unterscheidet man zwei verschiedene Wege, dem des lysosomalen Abbaus und dem durch die Kennzeichnung der Aggregate durch Proteasomen. Der Abbau über Lysosomen gilt als der wahrscheinlichere Weg für die Eliminierung von toxischen Oligomeren (127). Autophagozytose gehört zu den lysosomalen Wegen und stellt mit 17-AAG als Induktor für diesen Weg unter Umständen eine neue Therapieform gegen die α -Synuclein Aggregation bei PD dar (124).

Die Wirkung von 17-AAG wurde zum jetzigen Zeitpunkt allerdings lediglich *in vitro* nachgewiesen. Außerdem ist der molekulare Ansatzpunkt nicht ideal. 17-AAG greift erst die Aggregate von α -Synuclein an. Besser wäre eine Substanz, die es gar nicht zur Aggregation kommen lässt, sondern diese in ihrer Entstehung verhindert.

Ein weiteres potentiell Medikament, das in den Aggregationsprozess von α -Synuclein eingreift und hier eine hemmende Wirkung entfaltet, ist das Protein FK 506. Es inhibiert das FK 506 binding protein (FKBP), welches wiederum zur Familie der Immunophilinen gehört, Enzyme mit einer Peptidyl-prolyl Isomerasen. Sie sind für die Immunregulation und grundlegende zelluläre Prozesse wie die Proteinfaltung verantwortlich. FKBP beschleunigen nachweislich die Aggregation von α -Synuclein *in vitro*. Durch deren Inhibition mit FK506 kann diese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gestoppt werden (128). FK506 bindet als immunsuppressives Protein an FKBP, von denen vier verschiedene Arten im menschlichen Gehirn vorkommen (129). In diesem Zusammenhang wurden

vor kurzem die neuroprotektiven und neuroregenerativen Wirkungen von FK506 bei PD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen (130). Der genaue Wirkmechanismus ist nicht abschließend geklärt. Zunächst wurde angenommen, dass die immunsuppressive Komponente ausschlaggebend für die neuroprotektive Wirkung ist, diese These konnte jedoch widerlegt werden (131). Heute geht man davon aus, dass die Peptidyl-prolyl-Isomerasen eine Rolle bei der Degeneration von Neuronen spielen. Die FK506 abhängige Reduktion der α -Synuclein Aggregate kommt mit größter Wahrscheinlichkeit durch die Hemmung der Peptidyl-prolyl Isomerase FKBP12 und anderer FKBP's zustande (131).

FK 506 zeigt in *in vitro* Experimenten eine dosisabhängige Wirkung durch vermehrte Inhibition der Aggregation von α -Synuclein und einem Rückgang der Apoptose. Im Mausmodell, welches sehr ähnlich aufgebaut war, wie das in der vorliegenden Arbeit, konnte durch die orale Gabe von FK506 eine Verminderung der aggregierten α -Synuclein Partikel nachgewiesen werden, zwischen den verschiedenen hohen Dosierungen ergab sich kein signifikanter Unterschied (128).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nicht nur weniger Aggregationen auftraten, sondern auch schon mit α -Synuclein angereicherte Zellen länger überlebten, was später den Verlauf der Erkrankung lindern könnte. Damit stellt FK506 eine potentielle Substanz für die kausale Therapie von PD dar (128).

Eine Substanz, die schon in einer klinischen Studie getestet wurde ist der MAO-B-Hemmer Rasaglin. Die placebokontrollierte, doppelblinde, multizentrisch 72-wöchige Adagio-Studie untersuchte den krankheitsmodifizierenden Effekt auf PD. Unter der Therapie mit Rasaglin (1mg/Tag) wurden weniger zusätzliche Medikamente benötigt und es kam zu signifikanten Verbesserungen der motorischen Symptome und in der Lebensqualität (111).

Auch bei Antibiotika wurde in klinischen Studien ein neuroprotektiver Effekt entdeckt. Bei dem Tetracyclin, Minocyclin, welches bis dato zur Anwendung bei verschiedenen Infektionen diente, wurde bei dem antibakteriellen Effekt, einen antiinflammatorischen Effekt entdeckt. Diesen machte man sich bei der Behandlung von PD zunutze. Der Verlust der dopaminergen Neuronen führt zu einer inflammatorischen Antwort. In Folge dessen kann es zur Neurodegeneration kommen. In einer randomisierten doppelblinden

klinischen Studie konnte eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs von PD festgestellt werden (112).

Diese Beispiele stehen nur stellvertretend für die Arbeit vieler Forschungsgruppen, die sich mit der Thematik des PD und der kausalen Therapie beschäftigen. Es zeigt zum einen die Dringlichkeit und Wichtigkeit, eine neue Therapieform zu finden, zum anderen aber auch, dass es eine Vielzahl möglicher Ansatzpunkte für die Lösung dieser Probleme gibt.

Gemeinsamer Ansatzpunkt ist, das Voranschreiten der Krankheit zu verhindern, indem die Ursache, nämlich die Aggregation von α -Synuclein, bekämpft wird. Die symptomatische Therapie, vor allem der motorischen Defizite, ist weitgehend ausgereizt und bringt ab einem gewissen Krankheitsstadium keine Besserung mehr (11).

Anle138b und seine Derivate entstammen der Gruppe der DPP Substanzen, kleine Moleküle, die mit α -Synuclein interagieren und die Aggregation verhindern (9).

Es weist strukturell alle Charakteristika auf, die für Medikamente von Bedeutung sind (69) und zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den gewünschten Effekt (87).

Anle138b und seine Derivate erfüllen alle Kriterien von Lipinski's „rule of five“. Diese besagt, dass ein Molekül eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit als Medikament hat, wenn es maximal fünf Protonendonatoren aufweist, maximal zehn Protonenakzeptoren

hat, eine Molekülmasse kleiner 500g/mol besitzt und sein Verteilungskoeffizient, log P, maximal fünf beträgt. Diese Eigenschaften wurden im Jahr 1999 erweitert und konkretisiert (132): i) log P liegt in einem Bereich von -0,4 und 5,4 ii) die Molrefraktion liegt zwischen 40 und 130 iii) die molare Masse liegt zwischen 160 und 480 iv) die Gesamtzahl der Atome liegt zwischen 20 und 70. Diese Eigenschaften, vor allem die Lipophilie, führen zu einer guten Absorption und einer ausreichenden Membranpermeabilität *in vivo* (9). Außerdem ist für die Hemmung der Aggregation von α -Synuclein der aromatische Ring von zentraler Bedeutung (133).

In einer weiteren Arbeit wurde anhand von Phthalocyanin-Tetrasulfonat (PcTS) die spezifische Interaktion der aromatischen Ringe mit α -Synuclein gezeigt, welche die Aggregation hemmt (133).

Die primäre Bindungsstelle von PcTS liegt am N-terminalen Ende von α -Synuclein unter Einbeziehung der Aminosäure Tyrosin in Position 39. Der aromatische Ring des Moleküls bildet die Hauptstruktur für die Inhibition der α -Synuclein Aggregation. Kleine Moleküle mit eben diesem Design sind für die präventive Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen mit Proteinaggregation gut geeignet (133). Die Diskussion der weiteren Strukturmerkmale für die höchste Wirksamkeit am Menschen wurden im vorangegangenen Abschnitt beschrieben (vgl. E.2).

Für anle138b und seine Derivate hat sich die Verbindung zwischen den theoretisch geeigneten Molekülstrukturen und der tatsächlichen Wirksamkeit *in vivo* als richtig erwiesen.

Anle138b hat sich in mehreren *in vivo* Experimenten wirksam gezeigt auch, wenn es erst nach Eintreten der Krankheitssymptomatik verabreicht wurde. Es inhibiert nicht nur die Aggregation von α -Synuclein, sondern ist auch bei Prionerkrankungen wirksam. Sehr wahrscheinlich ließe sich auch bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Chorea Huntington ein Effekt nachweisen (87). Die Substanz ist damit potentiell vielseitig anwendbar. Anle253b und sery335b zeigten ebenfalls eine gute Wirksamkeit und können als gleichwertig in ihrer Wirksamkeit eingestuft werden. Alle Derivate können oral verabreicht werden.

Sie stellen damit eine vielversprechende und relativ weit entwickelte Substanz dar.

5. Ausblick

Die vier in diesem Experiment getesteten Substanzen zeigten *in vivo* unterschiedlich starke Wirksamkeit. Die mit der Substanz anle253b behandelten Tiere lebten sowohl absolut am längsten, als auch am längsten ohne Krankheitszeichen (vgl. D.3). Auch anle138b zeigte in beiden Kategorien eine gute Wirksamkeit. Die mit sery335b behandelten Tiere überlebten immer noch deutlich länger als die mit Placebo gefütterte Mäuse, aber nur halb so lang länger wie die mit anle253b behandelten Tiere. Die Behandlung mit sery383 verlängerte das Überleben um 21 Tage, zeigte in den statistischen Tests aber als einzige Substanz keine signifikante Wirkung (vgl. D.3 Tab.3 und 4). Für anle138b wurde in dieser Arbeit die Wirkung auch bei der Verabreichung der Substanz nach der 50. Lebenswoche gezeigt, einem Zeitpunkt, an dem erste

Symptome auftreten (vgl. D.3). Da anle253b und sery335b verlängerte Überlebenszeiten bewirkten, wäre ein solcher Versuch auch für diese Substanzen sinnvoll.

In dem vorliegenden Experiment war die Dosis der Substanzen in allen Gruppe gleich, ebenso in dem Vorgängerexperiment. Damit waren beide Versuche gut vergleichbar (87).

Für die klinische Einsetzbarkeit wäre relevant, inwiefern unterschiedliche Dosierungen die Wirksamkeit beeinflussen können, wie der Medikamentenspiegel im Blut bzw. im Gehirn bei verschiedenen Dosierungen ist. Gegenstand weitere Forschung sollte außerdem die Verträglichkeit sein, bis zu welchen Dosierungen die Substanzen unbedenklich eingenommen werden können.

Die orale Verabreichung stellt die Applikationsmethode der Wahl dar, da eine konstante Konzentration der Substanz im Körper gewährleistet werden kann. Zudem ist diese Form der Einnahme am einfachsten und angenehmsten für den Patienten.

Vor dem oben genannten Hintergrund sollten, die Substanzen anle138b, anle253b und sery335b weiterentwickelt werden. Zunächst wäre vorstellbar ein weiteres *in vivo* Experiment mit Gabe nach Ausbruch der Symptome durchzuführen. Weiterhin wäre es vorstellbar in Versuchen an Säugetieren, die keine Nagetiere sind, verschiedenen Gruppen unterschiedliche Dosierungen zu verabreichen, um einen Anhalt für Dosis wirksame Gewebespiegel zu erhalten, den man sinnvoll auf den Menschen übertragen kann.

Danach könnte der Übergang zur klinischen Phase-I-Studie mit gesunden Probanden erfolgen, um Informationen über die Pharmakokinetik am Menschen zu erlangen. Klinische Studien der Phase II und III könnten bei Erfolg folgen.

F. Zusammenfassung

Immer mehr Menschen sind von der neurodegenerativen Erkrankung PD betroffen. Neben motorischen Symptomen (Rigor, Tremor, Akinesie, posturale Instabilität) ist sie von Demenz, vegetativen Störungen und psychischen Problemen begleitet, die noch schlechter zu behandeln sind. Eine verlaufsmodifizierende Behandlung, die alle Symptome in der Entstehung verhindert oder zumindest deren Progression verlangsamt, wird dringend benötigt. Die bis jetzt üblichen und möglichen Behandlungen greifen rein symptomatisch in den Krankheitsverlauf ein.

Auf molekularer Ebene gilt mittlerweile als gesichert, dass intrazelluläre α -Synuclein Aggregate, die sich in Form von Lewy-Körperchen vor allem in den betroffenen Hirnarealen ansammeln, eine bedeutende Rollen in dem Pathomechanismus von PD und der Degeneration von dopaminergen Neuronen spielen.

Mithilfe der SIFT Technologie und anschließenden Versuchen in Zellkulturen und in Mausmodellen für Prionerkrankungen und PD wurden im Vorfeld dieser Arbeit kleine Moleküle entdeckt, die zur Hemmung der pathologischen Proteinaggregation führen. Damit könnten sie potentiell als kausal wirksame Medikamente für die Behandlung von PD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden.

Vier dieser Moleküle und ihre Wirksamkeit *in vivo* waren Gegenstand meiner Arbeit. Im Tierexperiment mit α -Synuclein überexprimierenden Mäusen wurden die vier Substanzen gegeneinander und gegenüber Placebo getestet. Die Zielparameter waren die absolute Überlebenszeit, die symptomfrei Überlebenszeit, das Gewicht und die histologisch sichtbaren α -Synuclein Ablagerungen.

Die Behandlung mit den Substanzen, anle138b, sery335b, sery383 und anle253b begann immer in der 30. Lebenswoche der Tiere. Lediglich anle138b wurde in einer weiteren Gruppe ab der 50. Lebenswoche verabreicht, dem Zeitpunkt an dem die ersten klinischen Symptome ausbrechen.

Das absolute Überleben und das Überleben ohne Krankheitszeichen wurden gegenüber der Kontrollgruppe durch die Behandlung mit anle253b am stärksten verlängert. Durch die Behandlung mit anle138b zeigte sich ein nur geringfügig kürzeres Überleben als bei der Behandlung mit anle253b. Auch die Substanz sery335b erzielt einen

überlebensverlängernden Effekt, der allerdings kleiner war als bei den vorher genannten Substanzen. Lediglich sery383 konnte statistisch kein signifikanter Effekt gegenüber der Placebogruppe nachgewiesen werden

Die anle138b behandelte Gruppe mit Gabe ab der 50. Woche zeigte eine signifikante Wirksamkeit gegenüber der Placebogruppe und eine leicht reduzierte Wirksamkeit gegenüber der mit anle138b behandelten Gruppe, die ab der 30. Woche die Substanz bekam. Trotzdem ist dieses Ergebnis von großer Bedeutung für die Anwendung am Menschen, da PD aktuell allein über die klinische Symptomatik diagnostiziert wird. Man hat also eine Substanz gefunden, die nach Eintritt klinischer Symptome im Krankheitsverlauf wirksam ist.

Die verwendeten Substanzen helfen auch unser Modell besser zu verstehen. Selbst wenn sie am Menschen nicht den zu erwartenden überlebensverlängernden Effekt zeigen, so dienen sie dazu das Verständnis des Pathomechanismus zu verbessern.

Unter den unterschiedlichen Ansatzpunkten zur kurativen Behandlung von PD, sind die Substanzen anle138, anle253b und sery335b auf dem Weg in den klinischen Studienabschnitt wegweisend. Sie wurden zum wiederholten Male *in vivo* getestet, nicht nur in ihrer Wirkung gegen die α -Synuclein-Aggregation sondern auch gegen Prion-Aggregationen. Anle138b verlängert das Überleben, auch wenn es zu einem im Krankheitsverlauf fortgeschrittenen Zeitpunkt gegeben wird und verzögert das Ausbrechen der Symptome.

G. Abkürzungsverzeichnis

17-AAH	17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin
A β	β -Amyloide
Abb.	Abbildung
AD	Morbus Alzheimer
ADMET-Eigenschaften	Absorption (Aufnahme in die Blutbahn), Distribution (Verteilung im Organismus), Metabolism (Verstoffwechselung), Excretion (Ausscheidung) und Toxicity (Toxizität)
AUC	area under the curve
cCT	craniale Computertomographie
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
COMT-Hemmer	Catechyl-O-Methyltransferase-Inhibitoren
DAB	3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DDI	Amionsäuredecarboxylase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinacid
DPP	3,5-diphenyl-pyrazole
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
FKBP	FK 506 Binding Protein
GABA	γ -Aminobuttersäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IVC	individual ventilated cages

kDa	KiloDalton (atomare Masseneinheit)
LADME	Liberation Absorption Distribution Metabolism Excretion
LB	Lewy-Bodies
L-Dopa	Levodopa = L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
M	Molar
MAO-B-Hemmer	Monoaminoxidase B Hemmer
MDS	Movement Disorder Society
Millipore	nach dem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitetes Wasser
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NAC	non-amyloid β component of AD amyloid plaques
NBB	N-benzylidene-benzohydrazide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PcTS	Phthalocyanin-Tetrasulfonat
PK	Proteinase K
pK _s	Maß für die Säurestärke
PrP ^{Sc}	Prion Protein Scrapie
R1-3	organischer Rest
RML	regional medical laboratory
RNA	Ribonucleinacid
RNAi	RNA Interferenz
rpm	rounds per minute
SAR	structure-activity relationship

SIFT	scanning for intensely fluorescent targets
SPF	spezifisch pathogenfreie Tierhaltung
SUVs	small unilammellar vesicles
T3	Triiodthyroxine
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
ZNS	zentrales Nervensystem

H. Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel
Abb. 1	Dreidimensionale Darstellung von α -Synuclein
Abb. 2	Pathologische α -Synuclein-Oligomere im histologischen Bild von α -Synuclein überexprimierenden transgenen Mäusen
Abb. 3	Experimenteller Verlaufsplan zur Etablierung einer neuen therapeutischen Substanz für Morbus Parkinson
Abb. 4	Grundstrukturformel der im Versuch getesteten Substanzen
Abb. 5	Behandlungsplan
Abb. 6	TSE RotaRod System
Abb. 7	Behandlungs- und Messplan
Abb. 8	Immunhistochemie mit dem Antikörper 15G7
Abb. 9	Absolute Laufleistung der Mäuse auf dem RotaRod pro Versuchsgruppe
Abb. 10	Relative Laufleistung der Mäuse auf dem RotaRod pro Versuchsgruppe
Abb. 11	Überlebenszeiten der Versuchstiere nach Versuchsgruppen
Abb. 12	Relative Gewichtsentwicklung der Mäuse Versuchsgruppe
Abb. 13	Kaplan-Meier Vergleich zum krankheitsfreien Überleben zwischen der Placebogruppe und allen Behandlungsgruppengruppen
Abb. 14	Kaplan-Meier-Vergleich zum krankheitsfreien Überleben zwischen der Placebogruppe und den einzelnen Behandlungsgruppen
Abb. 15	Kaplan-Meier Vergleich zum absoluten Überleben zwischen der Placebogruppe und allen Behandlungsgruppen
Abb. 16	Kaplan-Meier Vergleich zum absoluten Überleben zwischen der Placebogruppe und den einzelnen Behandlungsgruppen

Abb. 17	Immunhistochemie einer terminal erkrankten nicht behandelten Maus zum Todeszeitpunkt im Alter von 440 Tagen.
Abb. 18	Immunhistochemie einer Placebo behandelten Maus zum Zeitpunkt der terminalen Entnahme mit 527 Tagen
Abb. 19	Histologisches Schnitte des Hirnstammes einer mit anle138b behandelten Maus im Alter von 69 Wochen.
Abb. 20	Histologische Schnittbilder des Hirnstammes von zwei verschiedenen Mäusen beide im Alter von 69 Wochen und mit anle138b behandelt
Abb. 21	Histologische Schnittbilder der Nieren und der Milz von zwei verschiedenen Tieren in HE Färbung

I. Tabellenverzeichnis

Nr.	Titel
Tab. 1	Chemische Eigenschaften und Strukturformeln aller getesteten Substanzen
Tab. 2	Wirksamkeit der ausgewählten Substanzen in Vorversuchen
Tab. 3	Statistische Daten zum krankheitsfreien Überleben der Behandlungsgruppen jeweils im Vergleich zu der Placebogruppe
Tab. 4	Statistische Daten zur absoluten Überlebenszeit der Behandlungsgruppen jeweils im Vergleich zu der Placebogruppe
Tab. 5	Übersicht über das Auftreten von Gefäßpathologien bei den untersuchten Tieren in den Nieren und in der Milz nach Behandlungsgruppen

J. Literaturverzeichnis

1. B. Dubois, H.H. Feldman, C. Jacova, J.L. Cummings, S.T. Dekosky, et al.
Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon.
Lancet Neurol 9: 1118-1127 (2010)
2. A.B. Singleton, M.J. Farrer, V. Bonifati
The Genetics of Parkinson's Disease: Progress and Therapeutic Implications
Movement Disorders 28: 14-23 (2013)
3. C.G. Glabe, R. Kayed
Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis
Neurology 66: 74- 78 (2006)
4. A. J. Hughes, S.E.Daniel, Y.Ben Shlomo, A.J.Lees
The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service
Brain 125: 861-870 (2002)
5. H. K. Strüder, R. Kinscherf, K. Diserens, H. Weicker
Physiologie und Pathophysiologie der Basalganglien - Einfluss auf die Motorik
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 52: Nr. 12 350-360 (2001)
6. C.A. Ross, M.A. Poirier
Protein aggregation and neurodegenerative disease
Nature medicine 10: Suppl.: S10-7 (2004)
7. K. Vekrellis, H.J. Rideout, L. Stefanis
Neurobiology of alpha-synuclein
Mol. Neurobiol. 30: 1-21 (2004)
8. H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R.A. de Vos, E.N. Jansen Steuer, et al.
Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease
Neurobiol Aging 24: 197-211 (1999)
9. A.S. Hillmer, P. Putcha, J. Levin, T. Högen, B.T. Hyman, H.A. Kretzschmar, P.J. McLean, A. Giese
Converse modulation of toxic α -synuclein oligomers in living cells by N'-benzylidene-benzohydrazide derivatives and ferric iron
Biochem Biophys Res Commun. 391/1: 461-466 (2010)
10. M. Hoehn, M.D. Yahr
Parkinsonism: onset, progression and mortality.
Neurology 17: 427-442 (1967)
11. R.C. Dodel, M. Singer, R. Köhne-Volland, R. Selzer, W. Schol, zB. Rathay, W.H. Oertel

- Krankheitskosten der Parkinson-Erkrankung - Eine retrospektive dreimonatige Analyse der direkten Kosten
Nervenarzt 68: 978-984 (1997)
12. M.C. Kelton, H.J. Kahn, C.L. Conrath, P.A. Newhouse
The effects of nicotine on Parkinson's disease.
Brain Cogn. 43(1-3): 274-82 (2000)
13. G. Becker, A. Müller, S. Braune, T. Büttner, R. Benecke, et al.
Early diagnosis of Parkinson's disease
J Neurol 249: III:40-48 (2002)
14. E. R. Dorsey, R. Constantinescu, J. P. Thompson et al.
Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030
Neurology 68: 384 (2007)
15. M. S. Okun.
Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease
N Engl J Med.: 368/5: 483-484 (2013)
16. K.R. Chaudhuri, P. Martinez-Martin, A.H. Schapira et al.
International multi-center pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: the NMSQuest study.
Mov Disord 21: 916-23 (2006)
17. S. von Campenhausen, B. Bornschein, R. Wick, K. Bötzel, C. Sampaio, W. Poewe, W. Oertel, U. Siebert, K. Berger, R. Dodel
Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe
European Neuropsychopharmacology 15: 473 - 490 (2005)
18. M.S. Forman, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski
Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quagmire
Neuron 47: 479-482 (2005)
19. World Health Organization
Neurological Disorders Public Health Challenges
Conclusions and Recommendations Chapter 4: 177-179 (2007)
20. R.C. Dodel, K.M. Eggert, M.S. Singer, T.E. Eichhorn, O. Pogarell, W.H. Oertel
Costs of drug treatment in Parkinson's disease.
Mov Disord 13: 249-54 (1998)
21. K.A. Conway, J.C. Rochet, R.M. Bieganski, P.T. Lansbury Jr.
Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct
Science 294: 1346-1349 (2001)
22. G. Clark et al.

One hit model of cell death in inherited neuronal degenerations

- Nature 406: 195-199 (2000)
23. K.F. Winklhofer, J. Tatzelt, C. Haass
The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases
EMBO J 27: 336-349 (2008)
 24. T. Gasser
Overview of the genetics of parkinsonism
Adv Neurol 91: 152 (2003)
 25. T. Gasser
Update on the genetics of Parkinson's disease
Mov Disord 22: 343-350 (2007)
 26. R. Krüger, W. Kuhn, T. Müller, D. Woitalla, M. Graeber et al.
Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease
Nat Genet 18: 106-108 (1998)
 27. M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum
Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease
Science 276: 2045-2047 (1997)
 28. A.B. Singleton et al.
 α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease
Science 302: 841 (2003)
 29. A. Singleton, A. Myers, J. Hardy
The law of mass action applied to neurodegenerative disease: a hypothesis concerning the etiology and pathogenesis of complex disease
Hum. Mol. Genet 13: 123-126 (2004)
 30. A.B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M.R. Cookson, M. Muenter, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy, K. Gwinn-Hardy
alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease
Science 302: 841 (2003)
 31. J. Chao, W. Kwok-Wai Lau, M.J. Huie, Yuen-Shan Ho, Man-Shan Yu, Cora Sau-Wan Lai, M. Wang, Wai-Hung Yuen, Wai Har Lam, Tak Hang Chan, Raymond Chuen-Chung Chang
A pro-drug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) prevents differentiated SH-SY5Y cells from toxicity induced by 6-hydroxydopamine
Neuroscience Letters 469: 360-364 (2010)

32. M.A. Hernán, B. Takkouche, F. Caamaño-Isorna, J.J. Gestal-Otero
A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking and the risk of Parkinson's disease.
Ann. Neurol. 52: 276–284 (2002)
33. J. De Reuck, M. De Weweire, G. Van Maele, P. Santens
Comparison of age of onset and development of motor complications between smokers and non-smokers in Parkinson's disease.
J. Neurol. Sci. 231: 35–39 (2005)
34. G.E. Barreto, A. Jarkov, V.E. Moran
Beneficial effects of nicotine, cotinine and its metabolites as potential agents for Parkinson's disease.
Front Aging Neurosci. 9, 6:340 (2015)
35. D.E. Ehrnhoefer, J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, M. Masino, R. Lurz, S. Engemann, A. Pastore, E.E. Wanker
EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomeres
Nat Struct Mol Biol 15: 558–566 (2008)
36. S.A. Mandel, T. Amit, L. Kalfon, L. Reznichenko, M.B. Youdim,
Targeting multiple neurodegenerative diseases etiologies with multimodal-acting green tea catechins
J. Nutr. 138: 1578–1583 (2008)
37. C. M. Tanner, F. Kamel, G. W. Ross, J. A. Hoppin, S. M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G. S. Bhudhikanok, M. Kasten, A. R. Chade, K. Comyns, M. B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D. M. Umbach, A. Blair, D. P. Sandler, J. W. Langston
Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease
Environ Health Perspect 119: 866–872 (2011)
38. K. Kiebertz, K.B. Wunderle
Parkinson's Disease: Evidence for Environmental Risk Factors
Movement Disorders 28: 8–13 (2013)
39. E. Tolosa, G. Wenning, W. Poewe
The diagnosis of Parkinson's disease
Lancet Neurol 5: 75–86 (2006)
40. O. Rascol, D.J. Brooks, A.D. Korczyn, P.P. De Deyn, C.E. Clarke, A.E. Lang
A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group.
N Engl J Med 342: 1484–91 (2000)
41. T. Müller
Drug therapy in patients with Parkinson's disease
Translational Neurodegeneration: 2–12 (2012)

42. O. Rascol, D.J. Brooks, E. Melamed et al.

Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations
Lancet 365: 947-54 (2005)
43. S. Fahn
Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome.
Ann N Y Acad Sci 991: 1-14 (2003)
44. Deep-Brain Stimulation for Parkinson Disease Study Group
Deep-Brain stimulation of the subthalamic nucleus or the pars interna of the globus pallidus in Parkinson's disease
N Engl J Med 345: 956-63 (2001)
45. G. Deuschl, C. Schade-Brittinger, P. Krack, J. Volkmann, H. Schafer et al.
A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease
N Engl J Med 355: 896-908 (2006)
46. M.S. Okun
Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease
N Engl J Med 367: 1529-38 (2012)
47. L. Wojtecki, M. Südmeyer, A. Schnitzler
Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms
Deutsches Ärzteblatt cme Kompakt (2009)
48. A. Iwai, E. Masliah, M. Yoshimoto, N. Ge, L. Flanagan et al.
The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of central nervous system
Neuron 14: 467-475 (1995)
49. K. Beyer
alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers
Acta Neuropathol 112: 237-251 (2006)
50. M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia et al.
Mutation in the α -Synuclein gene identified in families with Parkinson's disease
Science 276: 2045-2047 (1997)
51. J.J. Zarranz, J. Alegre, J.C. Gomez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros et al.
The new mutation, E46K, of α -Synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia
Ann Neurol 55: 164-173 (2004)
52. R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Goedert
Identification of two distinct synucleins from human brain
FEBS Lett 345: 27-32 (1994)
53. B.I. Giasson, I.V. Murry, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee

- A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α -Synuclein is essential for filament assembly
J Biol Chem 276: 2380-2386 (2001)
54. V.N. Uversky, J. Li, P. Souillac, I.S. Millett, S. Doniach et al.
Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of α -Synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins
J Biol Chem 277: 11970-11978 (2002)
55. M. Okochi, J. Walter, A. Koyama, S. Nakajo, M. Baba et al.
Constitutive phosphorylation of Parkinson's disease associated α -Synuclein
J Biol Chem 275: 390-397 (2000)
56. S.R. Paik, H.J. Shin, J.H. Lee., C.S. Chang, J. Kim
Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein.
Biochem J 340: 821-828 (1999)
57. K. Beyer
Mechanistic aspects of Parkinson's disease: alpha-synuclein and the biomembrane
Cell Biochem Biophys 47: 285-299 (2007)
58. V.N. Uversky
Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation
J. Neurochem. 103: 17-37 (2007)
59. W.S. Davidson, A. Jonas, D.F. Clayton, J.M. George
Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes
J Biol Chem 273(16): 9443-9449 (1998)
60. T. Högen, J. Levin, F. Schmidt, M. Caruana, N. Vasallo et al
Two different binding modes of alpha-synuclein to lipid vesicles depending on its aggregation state
Biophys J 102 (2012)
61. D.D. Murphy, S.M. Rueter, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee
Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons
J Neurosci 20: 3214-3220 (2000)
62. A. Abeliovich, Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W.H. Ho, P.E. Castillo, N. Shinsky, J.M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, A. Rosenthal
Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system.
Neuron 25: 239-252. (2000)
63. J.M. Jenco, A. Rawlingson, B. Daniels, A.J. Morris
Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins

- Biochemistry 37: 4901-4909 (1998)
64. A. Recchia, P. Debetto, A. Negro, D. Guidolin, S.D. Skaper, P. Giusti
Alpha-synuclein and Parkinson's disease
FASEB J 18: 617-626 (2004)
 65. N. Ostrerova, L. Petrucelli, M. Farrer, N. Mehta, P. Choi, J. Hardy, B. Wolozin
Alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins.
J Neurosci 19: 5782-5791 (1999)
 66. M.G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert
Alpha-synuclein in Lewy bodies
Nature 388: 839-840 (1997)
 67. M.J. Voiles et al.
Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein: implications for the
pathogenesis and treatment of Parkinson's disease
Biochemistry 40: 7812-7819 (2001)
 68. G. Bitan, E.A. Fradinger, S.M. Spring, D.B. Teplow
Neurotoxic protein oligomers -what you see is not always what you get.
Amyloid. 12: 88-95 (2005)
 69. M. Kostka, T. Högen, K.M. Danzer, J. Levin, M. Habeck, A. Wirth, R. Wagner, C.G.
Glabe, S. Finger, U. Heinzelmann, P. Garidel, W. Duan, C.A. Ross, H. Kretzschmar, A.
Giese
Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein
oligomers.
J.Biol.Chem. 283: 10992-11003 (2008)
 70. R. Kaye, Y. Sokolov, B. Edmonds, T.M. McIntire, S.C. Milton, J.E. Hall, C.G. Glabe
Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity
of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases
J. Biol. Chem. 279: 46363-46366 (2004)
 71. T.F. Outeiro, P. Putcha, J.E. Tetzlaff, R. Spoelgen, M. Koker, F. Carvalho, B.T.
Hyman, P.J. McLean
Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells
PLoS ONE 3: 1867 (2008)
 72. M.B. Feany, W.W. Bender, A. Drosophila
Model of Parkinson's disease
Nature 404: 394-398 (2000)
 73. S. Talarek, J. Orzelska, J. Listos, A. Mazur, S. Fidecka
Effects of chronic flunitrazepam treatment schedule on therapy-induced sedation
and motor impairment in mice
Pharmacol Rep 65/1: 50-8 (2013)
 74. E. Masliah, E. Rockenstein, I. Veinbergs, M. Mallory, M. Hashimoto, A. Takeda, Y.
Sagara, A. Sisk, L. Mucke

- Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders
Science 287: 1265–1269 (2000)
75. P.H. Weinreb, W. Zhen, A.W. Poon, K.A. Conway, P.T. Jr. Lansbury
NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded
Biochemistry 35: 13709-13715 (1996)
76. D. Berg, Ronald B. Postuma, C. H. Adler, B. R. Bloem, P. Chan, B. Dubois, T. Gasser, C. G. Goetz, G. Halliday, L. Joseph, A. E. Lang, I. Liepelt-Scarfone, I. Litvan, K. Marek, J. Obeso, W. Oertel, C. Warren Olanow, W. Poewe, M. Stern, G. Deuschl
MDS Research Criteria for Prodromal Parkinson's Disease
Mov. Dis., Vol. 30, No. 12: 1600-1609 (2015)
77. S. J. Wood, J. Wypych, S. Steavenson, J.C. Louis, M. Citron, A.L. Biere, A. L
alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent
Implications (1999)
78. J. Levin, T. Högen, A.S. Hillmer, B. Bader, F. Schmidt, F. Kamp, H.A. Kretzschmar, K. Bötzel, A. Giese
Generation of Ferric Iron Links Oxidative Stress to α -Synuclein Oligomer Formation.
Journal of Parkinson's Disease 1: 205-216 (2011)
79. M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli
Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding disease
Nature 416: 507-511 (2002)
80. R. Sharon et al.
The formation of highly soluble oligomers of α -synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease
Neuron 37: 583-595 (2002)
81. E. Sofic, P. Riederer, H. Heinsen, H. Beckmann, G.P. Reynolds, G. Hebenstreit, M.B. Youdim
Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain
J Neural Transm 74: 199-205 (1988)
82. A. Gaeta, R.C. Hider
The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy.
Br J Pharmacol. 146: 1041-1059 (2005)
83. D.B. Shachar, N. Kahana, V. Kampel, A. Warshawsky, M.B. Youdim
Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats.
Neuropharmacology 46: 254-263 (2004)

-
84. X. Zhang, W. Xie, S. Qu, T. Pan, X. Wang
Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration
Biophys Res Commun 333: 544-549 (2005)
85. M.J. Volles, S.J. Lee, J.C. Rochet, M.D. Shtilerman, T.T. Ding, J.C. Kessler, P.T.Jr. Lansbury
Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease
Biochemistry 40: 7812-7819 (2001)
86. H.A. Lashuel, D. Hartley, B.M. Petre, T. Walz, P.T.Jr. Lansbury
Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations
Nature 418: 291 (2002)
87. J. Wagner, S. Ryazanov, A. Leonov, J. Levin, S. Shi, F. Schmidt, C. 87, F. Pan-Montojo, U. Bertsch, G. Mitteregger-Kretzschmar, M. Geissen, M. Eiden, F. Leidel, T. Hirschberger, A.A. Deeg, J.J. Krauth, W. Zinth, P. Tavan, J. Pilger, M. Zweckstetter, T. Frank, M. Bähr, J. Weishaupt, M. Uhr, H. Urlaub, U. Teichmann, M. Samwer, K. Bötzel, M. Groschup, H. Kretzschmar, C. Griesinger, A. Giese
Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease.
Acta Neuropathologica 125: 795-813 (2013)
88. B.L. Davidson, H.L. Paulson
Molecular medicine of the brain: silencing of disease genes with RNA interference
Lancet Neurol. 3: 145-149 (2004)
89. D. Hausecker, M.A. Kay
RNA interference. Drugging RNAi.
Science 6: 347 (2015)
90. V.M. Miller et al.
Allele-specific silencing of dominant disease genes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 7195-7200 (2003)
91. A.J. McClellan, J. Frydman
Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause
Nat. Cell Biol. 3: E51.53 (2001)
92. P.W. Piper
The Hsp90 chaperone as a promising drug target
Curr. Opin. Investig. Drugs 2: 1606-1610 (2001)
93. A.L. Goldber
Protein degradation and protection against misfolded proteins
Nature 426: 895-899 (2003)
94. A. Yamamoto, J.J. Lucas, R. Hen
Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of

- Huntington's disease
Cell 101: 57-66 (2000)
95. M. Neumann, P.J. Kahle, B.I. Giasson, L. Ozmen, E. Borroni, W. Spooen, V. Müller, S. Odoy, H. Fujiwara, M. Hasegawa, T. Iwatsubo, J.Q. Trojanowski, H.A. Kretzschmar, C. Haass
Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies
J. Clin. Invest. 110: 1429-14 (2002)
 96. J. Bieschke, A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, S. Poser, M. Eigen, H. Kretzschmar
Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets
PNAS 97/10: 5468-5473 (2000)
 97. T. Högen
Einzelmolekülanalyse von eiseninduzierten, porenbildenden -
Synucleinoligomeren: Von der molekularen Pathologie zur kausalen Therapie
Dissertation (2009)
 98. P. Politzer, J. S. Murray, T. Clark
Halogen bonding and other r-hole interactions: a perspective
Phys. Chem. Chem. Phys. 15: 11178 (2013)
 99. C.G. Glabe, R. Kaye
Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis.
Neurology. 66: 74-78 (2006)
 100. D. E. Clark,
In silico prediction of blood-brain barrier permeation.
Drug Discov.Today. 8: 927-933 (2003)
 101. C. Freichel, M. Neumann, T. Ballard, V. Müller, M. Woolley, L. Ozmen, E. Borroni, H. A. Kretzschmar, C. Haass, W. Spooen, P. J. Kahle
Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in α -synuclein transgenic mice
Neurobiology of Aging 28: 1421-1435 (2007)
 102. <http://www.tse-systems.com/products/behavior/motor-function/rotarod.htm>
12.07.2015
 103. U. Bertsch, K. F. Winklhofer, T. Hirschberger, J. Bieschke, P. Weber, F. U. Hartl, P. Tavan, J. Tatzelt, H. A. Kretzschmar, A. Giese
Systematic Identification of Antiprion Drugs by High-Throughput Screening Based on Scanning for Intensely Fluorescent Targets
JOURNAL OF VIROLOGY: 7785-7791 (2005)
 104. J. Levin, F. Schmidt, C. Boehm, C. Prix, K. Bötzel, S. Ryazanov, A. Leonov, C. Griesinger, A. Giese

- The oligomer modulator anle138b inhibits disease progression in a Parkinson mouse model even with treatment started after disease onset
Acta Neuropathol. 127: 779-780 (2014)
105. M. R. Scholfield, C. M. Vander Zanden, M. Carter, P. Shing Ho
Halogen bonding (X-bonding): A biological perspective
Protein Science 22/2: 139–152 (2013)
106. M. Kola, P. Hobza, A. K. Bronowska
Plugging the explicit δ -holes in molecular docking
Chem. Commun. 49: 981-983 (2013)
107. T. Clark, M. Hennemann, J.S. Murray, P. Politzer
Halogen bonding: the sigma-hole. Proceedings of Modeling interactions in biomolecules II
J Mol Model 13: 291–296 (2007)
108. R. Wilcken, X. Liu, M.O. Zimmermann, T.J. Rutherford, A.R. Fersht, A.C. Joerger, F.M Boeckler
Halogen- enriched fragment libraries as leads for drug rescue of mutant p53.
J Am Chem Soc 134: 6810–6818 (2012)
109. A.R. Voth, F.A. Hays, P.S. Ho
Directing macromolecular conformation by halogen bonds.
Proc Natl Acad Sci USA 104: 6188–6193 (2007)
110. D. G. J. Battin, T. A. Varkey
Neuropsychiatric manifestation of bromide ingestion
Postgraduate Medical Journal 58: 523-524 (1982)
111. M. Levin
Experimental bromide intoxication, a criticism.
American Journal of Psychiatry 108: 309 (1951)
112. G. Torosian, K.F. Finger, R.B. Stewart
Hazards of bromides in proprietary medications.
American Journal of Hospital Pharmacy 30: 716 (1973)
113. S. Hellerstein, C. Kaiser, D. DeS. Darrow, D.C. Darrow
The distribution of bromide and chloride in the body
J Clin Invest. 39/2: 282–287 (1960)
114. P.C. Whybrow, J.A. Ewing
Self perpetuation of bromism.
British Medical Journal 2: 886 (1966)
115. D.V. Schapira
Bromide intoxication.
Can Med Assoc J. 115/2: 116 (1976)

-
116. A.M. Freedman, H.I. Kaplan, B.J. Sadack
Psychiatric classifications
Comprehensive Text Book of Psychiatry 12: 1110-1111 (1978)
 117. A. Ruiz-Garci, M. Bermejo, A. Moss, V.G. Casabo
Pharmacokinetics in drug discovery
J Pharm Sci. 97(2): 654-90 (2008)
 118. M. Gibaldi
Pharmacokinetic aspects of drug metabolism.
Ann N Y Acad Sci. 179: 19-31 (1971)
 119. T.R. Mhyre, J.T. Boyd, R.W. Hamill, K.A. Maguire-Zeiss
Parkinson's disease
Subcell. Biochem. 65: 389-455 (2012)
 120. B.S. Gadad, G.B. Britton, K.S. Rao
Targeting oligomers in neurodegenerative disorders: lessons from α -synuclein, tau, and amyloid- β peptide.
J. Alzheimers Dis. 24: 223-232 (2011)
 121. H. Przuntek, T. Müller, P. Riederer
Diagnostic staging of Parkinson's disease: conceptual aspects
J Neural Transm 111: 201–216 (2004)
 122. Maroteaux, J.T. Campanelli, R.H. Schneller
Synuclein – A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve-terminal
J Neurosci 8: 2804-2815 (1988)
 123. K.C. Luk, C. Song, P. O'Brien, A. Stieber, J.R. Branch, K.R. Bruden, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee
Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells
Proc Natl Acad Sci U S A. 106/47: 20051-20056 (2009)
 124. M. Riedel, O. Goldbaum, L. Schwarz, S. Schmitt, C. Richer-Landsberg
17-AAG induces cytoplasmic α -synuclein aggregate clearance by induction of autophagy
PLoS One. 5/1: e8753 1-8 (2010)
 125. L. Neckers
Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents.
Trends Mol Med. 8: 55–61 (2002)
 126. A. Sittler, R. Lurz, G. Lueder, J. Priller, H. Lehrach et al.
Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntington aggregation in a cell culture model of Huntington's disease.
Hum Mol Genet. 10: 1307–1315 (2001)
 127. H.J. Lee, F. Khoshaghideh, S. Patel, S.J. Lee

- Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway.
J Neurosci. 24: 1888–1896 (2004)
128. M. Gerard, A. Deleersnijder, V. Daniels, S. Schreurs, S. Munck, V. Reumers, Pottel, Y. Engelbourghs, C. Van den Haute, J.-M. Taymans, Z. Debyser, V. Baekelandt
Inhibition of FK506 Binding Proteins Reduces α -Synuclein Aggregation and Parkinson's Disease-Like Pathology
J. of Neuroscience 30/7: 2454-2463 (2010)
129. J.P. Steiner, T.M. Dawson, M. Fotuhi, C.E. Glatt, A.M. Snowman, N. Cohen, S.H. Snyder
High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin
Nature 358: 584-587 (1992)
130. M. Avramut, A. Zeevi, C.L. Achim
The immunosuppressant drug FK506 is a potent trophic agent for human fetal neurons
Brain Res Dev 132: 151-157 (2001)
131. F. Edlich, M. Weiwad, D. Wildemann, F. Jarczowski, S. Kilka, M.C. Moutty, G. Jahreis, C. Lücke, W. Schmidt, F. Striggow, G. Fischer
The specific FKBP38 inhibitor N cyclohexamide has potent neuroprotective and neurotrophic properties in brain ischemia
J Biol Chem 281: 14961-14970 (2006)
132. A.K. Ghose, V.N. Viswanadhan, J.J. Wendoloski
A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases.
J Comb Chem. 1(1): 55-68 (1999)
133. G. R. Lamberto, A. Binolfi, M. L. Orcellet, C. W. Bertoncini, M. Zweckstetter, C. Griesinger, C. O. Fernández
Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on α -synuclein amyloid fibril formation
Proc Natl Acad Sci U S A 106/50: 21057–21062 (2009)

K. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Armin Giese für die Überlassung der Themas sowie die Förderung und Betreuung der experimentellen Arbeit danken. Wesentlichen Einfluss auf die Arbeit hatten auch die Einblicke in den Wissenschaftsbetrieb, die er mir ermöglicht hat.

Herrn PD Dr. Johannes Levin danke ich für die Hilfestellung bei der Erarbeitung der Statistik und den theoretischen Grundlagen. Danken möchte ich ihm weiterhin für die motivierenden Worte und für das Voranbringen der Veröffentlichungen und der schriftlichen Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Felix Schmidt für sein unermüdliches Engagement und die tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente und der Ausarbeitung der schriftlichen Dissertation. Er war zu jeder Tages- und Nachtzeit der Mann vor Ort und erster Ansprechpartner bei jeglichen Fragestellungen und Problemen. Mit großer Dankbarkeit werde ich an unsere Zusammenarbeit zurückdenken, er wird immer ein Vorbild in Disziplin und Hilfsbereitschaft sein.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn M.K. Schmidt für die Bereitstellung der histologischen Schnitte.

Danken möchte ich außerdem Frau Dr. J. Pöschel stellvertretend für die Tierpfleger, die stets die gute Versorgung der Versuchstiere und den korrekten Ablauf der Tierexperimente gewährleistet haben.

Herrn P. Schmitz verdanke ich die reibungslose und unkomplizierte Nutzung aller erforderlichen elektronischen Geräte.

Für das Heranführen an die Wissenschaft von Kindesbeinen an danke ich meinem Daddy, für die bedingungslose Unterstützung und den unerschütterlichen Glauben an mich danke ich meiner Mama, für das immerwährende Verständnis und seine Geduld danke ich meinem Freund Christian Schöner.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Cathrin Böhm, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Entwicklung einer krankheitsmodifizierenden Therapie für Morbus Parkinson

-

*Wirkung des Proteinaggregationsmodulators anle138b und Derivaten in
einem transgenen Mausmodell*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Heidenheim, 28.02.2018

Cathrin Böhm